

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und  
Medizinische Mikrobiologie mit Medizinaluntersuchungsamt  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk  
Institut für Immunologie und Umwelthygiene  
Leiter: Prof. Dr. D. Gemsa

---

**Einfluß von Influenza A-Viren auf Stoffwechsel,  
Proliferation, Zytokin- und Chemokinsynthese tonsillärer B-  
Lymphozyten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie  
(Theoretische Medizin)

dem Fachbereich Humanmedizin der  
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
**Marion Jacob**  
aus Herrenberg/Kayh

Marburg 1998

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer  
Referent: Prof. Dr. D. Gemsa  
Korreferent:

Setz dich hin vor die Tatsache  
wie ein kleines Kind  
und sei bereit,  
alle vorgefaßten Meinungen aufzugeben,  
folge demütig der Natur,  
wohin sie dich auch führen mag,  
denn sonst erfährst du nichts.

T.H. Huxley

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	B-Lymphozyten	1
1.1.1.	B-Zell-Entwicklung	2
1.1.2.	Einfluß von Zytokinen auf die B-Zell-Reifung	3
1.1.3.	B-Zell-Gedächtnis	5
1.2.	B-Zellen und Autoimmunerkrankungen	7
1.3.	Oberflächen-Ag der B-Lymphozyten und anderer Zellen	7
1.3.1.	CD19	8
1.3.2.	CD22	8
1.3.3.	CD23	8
1.3.4.	CD40	9
1.3.5.	CD69	9
1.3.6.	CD126	9
1.3.7.	CD4	10
1.3.8.	CD8	10
1.3.9.	CD14	14
1.3.10.	CD56	11
1.3.11.	CD83	11
1.4.	Influenza A-Viren	11
1.4.1.	Nomenklatur und Einordnung der Virusstammes A/PR/8	12
1.4.2.	Charakterisierung und Morphologie	12
1.4.3.	Infektion und Replikation	14
1.4.4.	Antigendrift und Antigen shift	15
1.4.5.	Pathogenität	16
1.4.6.	Immunantwort gegenüber Influenza A-Viren	17
1.5.	Zytokine	18

## Inhaltsverzeichnis

---

1.5.1.	Interferone	18
1.5.1.1.	Interferon- $\alpha$ und - $\beta$	18
1.5.2.	Interleukine	18
1.5.2.1.	IL-4	19
1.5.2.2.	IL-5	19
1.5.2.3.	IL-6	20
1.5.2.4.	TNF- $\alpha$ und - $\beta$	20
1.5.2.5.	Interferon- $\gamma$	21
1.6.	Chemokine	22
1.6.1.	IL-8	22
1.6.2.	MCP-1	22
1.6.3.	MIP-1 $\alpha$ und MIP-1 $\beta$	22
1.7.	Apoptose	23
1.7.1.	Bcl-2 und bcl-x	23
1.8.	Zielsetzung	24
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1.	Material	25
2.1.1.	Medien und Geräte	26
2.1.2.	Zelllinien	27
2.1.3.	Influenza A-Viren	28
2.1.4.	Chemikalien	28
2.2.	Methoden	32

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.1.	Isolierung tonsillärer B-Lymphozyten	32
2.2.2.	Infektion der B-Zellen mit Influenza A-Viren	32
2.2.3.	Stimulierung der B-Zellen	33
2.2.4.	Gewinnung der Zellüberstände und der RNA	33
2.2.5.	Bestimmung der Vitalität	33
2.2.5.1.	LDH-Bestimmung	33
2.2.5.2.	MTT-Test	34
2.2.6.	Durchflußzytometrie	34
2.2.6.1.	Färbung der Oberflächenantigene	36
2.2.7.	Methoden zum Nachweis von Influenza-Viren	36
2.2.7.1.	PCR	36
2.2.7.1.1.	RNA-Isolierung	36
2.2.7.1.2.	Synthese des cDNA-Erst-Stranges	36
2.2.7.1.3.	Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR	37
2.2.7.1.4.	Primerauswahl, -sequenzen, -herstellung und -aufbereitung	38
2.2.7.1.5.	Amplifizierungsreaktion	39
2.2.7.1.6.	Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte	40
2.2.7.2.	Nachweis der Proteinbiosynthese	40
2.2.7.3.	Plaquetest	46
2.2.8.	Vermehrung und Reinigung von Influenza A-Viren	48
2.2.8.1.	Isolierung der Influenza-Glykoproteine HA und NA	51
2.2.8.2.	Coomassie Brilliant Blue Färbung	51
2.2.9.	Nachweis von Zytokinen	52
2.2.10.	Nachweis von Chemokinen	52
2.2.11.	Nachweis von IFN- $\alpha$ und - $\beta$	53

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.11.1.	Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde	53
2.2.11.1.1.	Plasmidlinearisierung	53
2.2.11.1.2.	DIG-RNA-Markierung	54
2.2.11.1.3.	Überprüfung der Sonde	54
2.2.11.1.4.	Farbreaktion mit NBT und X-Phosphat	56
2.2.11.1.5.	Northern Blot-Analyse	57
2.2.11.2.	Nachweis von IFN- $\alpha$ und - $\beta$ im Bioassay	58
2.2.12.	Nachweis der B-Zell-Proliferation	59
2.2.13.	Immunhistochemische Färbungen	60
2.2.14.	Neuraminidase-Behandlung von Hammelerythrozyten	60
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
3.1.	Zellverteilung in Tonsillen	61
3.1.1.	Reinheit der B-Lymphozyten nach Isolierung	64
3.2.	Adsorption von Influenza-Viren an B-Zellen	66
3.3.	Replikation von Influenza-Viren in B-Lymphozyten	69
3.3.1.	Nachweis von Virus-mRNA	69
3.3.2.	Synthese von Virusproteinen	70
3.3.3.	Entstehung infektiöser Viruspartikel	73
3.4.	Vitalität der B-Zellen	76
3.4.1.	Nachweis über Trypanblau-Färbung	76
3.4.2.	LDH-Nachweis	77
3.4.3.	MTT-Assay	78
3.4.3.1.	Stoffwechselaktivität in Raji-Zellen	79
3.4.3.2.	Stoffwechselaktivität in IM-9-Zellen	80
3.4.3.3.	Stoffwechselaktivitätsvergleich in peripheren B-Zellen und Monozyten	82

## Inhaltsverzeichnis

---

3.4.3.4.	Stoffwechselaktivität in tonsillären B-Lymphozyten	83
3.5.	Proliferation der B-Lymphozyten	86
3.5.1.	Proliferation tonsillärer Zellen vor der B-Zellisolierung	87
3.5.2.	Proliferation isolierter B-Zellen	88
3.5.2.1.	Proliferation unter Verwendung verschiedener Influenza A-Stämme ohne Zusatz von PWM	89
3.5.2.2.	Proliferation unter Verwendung verschiedener Influenza A-Stämme nach Zugabe von PWM	90
3.5.2.3.	Proliferation nach Einsatz UV-inaktivierter Viren	91
3.5.2.4.	Kinetikdarstellung der Proliferation	92
3.6.	Zytokin-Produktion	94
3.6.1.	Interleukin-4	94
3.6.2.	Interleukin-5	94
3.6.3.	Interleukin-6	95
3.6.4.	TNF- $\beta$	97
3.6.5.	IFN- $\gamma$	99
3.7.	Untersuchung der Produktion antiviral wirksamer Substanzen	
3.7.1.	Interferon	101
3.7.1.1.	Interferon-Nachweis auf mRNA-Ebene	101
3.7.1.1.1.	Nachweis über PCR	101
3.7.1.1.2.	Nachweis im Northern Blot	102
3.7.1.2.	Proteinnachweis	103
3.7.1.2.1.	IFN-Bioassay auf MDBK-Zellen	104
3.7.1.2.2.	IFN-Bioassay auf HeLa-Zellen	105
3.8.	Chemokinproduktion	108
3.8.1.	Interleukin-8	108
3.8.2.	MCP-1	110
3.8.3.	MIP-1 $\alpha$ und - $\beta$	112



## Inhaltsverzeichnis

---

3.9.	CD23-Expression	115
3.10.	Expression weiterer Oberflächenmarker	118
3.11.	Apoptose-Nachweis in B-Zellen	122
3.11.1.	bcl-2	122
3.11.2.	bcl-X	122
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>126</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>149</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>151</b>

## Abkürzungen

---

Abb.	Abbildung
APR/8	Influenza A/PR/8/34
A2	Influenza A/Singapore/1/57
aqua dest	entionisiertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
BrdU	Bromdeoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
Con A	Concanavalin A
DAB	Diaminobenzidin
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

## Abkürzungen

---

h	Stunde
HA	Hämagglutinin
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton
LAL	Limulus amoebocyte lysate
LDH	Lactatdehydrogenase
LiCl	Lithiumchlorid
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
M	Matrixprotein
MCP	monocyte chemoattractant protein
M-CSF	monocyte-macrophage colony-stimulating factor
MDCK	Madin and Darby canine kidney cell
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
MIP	macrophage inflammatory protein
ml	Milliliter
MOI	multiplicity of infection
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
N	Nukleoprotein
NA	Neuraminidase
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid

## Abkürzungen

---

OD	optische Dichte
Oligo-dT	Oligo-Desoxythymidin
OPD	o-Phenylendiamin-dihydrochlorid
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFU	plaque forming units
PHA	Phytohämagglutinin
p.i.	post infectionem
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PWM	poke weed mitogen
rlu	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RPMI <sup>suppl</sup>	RPMI-Medium mit Zusätzen
RSV	respiratory syncytical virus
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
<sup>35</sup> S	Schwefel 35
SA	staphylococcus aureus
S.D.	standard deviation
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA

## Abkürzungen

---

TGF	transforming growth factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminmethan
U	units
UV	Ultraviolett
V	Volt
VSV	vesicular stomatitis virus
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
X-Phosphat	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
ZT	Zimmertemperatur

### **1. Einleitung**

#### **1.1. B-Lymphozyten**

B-Zellen nehmen neben den T-Zellen und den Makrophagen eine zentrale Rolle bei einer Immunantwort ein, da sie zur Antikörperproduktion befähigt sind. Sie gehören zu den Lymphozyten und entstammen wie alle Blutzellen dem Knochenmark. Morphologisch betrachtet sind es kleine Zellen mit einem Durchmesser von ca. 8  $\mu\text{m}$ . Da B-Zellen große Mengen von Antikörpern (Ak) produzieren können, besitzen sie einen stark ausgeprägten Proteinbiosyntheseapparat und einen extrem großen Zellkern. Ihr Anteil an der Gesamt-Leukozytenpopulation beträgt ungefähr 2-7%, jedoch kann sich dieser Wert stark erhöhen, wenn der Organismus an einem Infekt leidet.

Immunglobuline (Ig) müssen zwei Funktionen erfüllen: Sie müssen Bindungsstellen für die unermessliche Vielzahl von Antigenen (Ag) besitzen, und sie benötigen einen konstanten Bereich, der die Kommunikation innerhalb des Immunsystems ermöglicht.

Seit den fünfziger Jahren gilt die klonale Selektionstheorie, die besagt, daß die "Paßform" der Immunglobuline genetisch determiniert ist und nicht erst durch ein Antigen geprägt wird. Jede antikörperproduzierende Zelle synthetisiert nur einen Antikörpertyp, der zum Teil auf der Zellmembran exponiert wird. Erst wenn ein Antigen an die membranständigen Ak bindet, wird diese Zelle aktiviert und teilt sich. Der entstandene Zellklon sezerniert große Ak-Mengen, die alle gegen das gleiche Ag gerichtet sind. Dies setzt die Möglichkeit voraus, Millionen verschiedener Ak zu bilden (Tonegawa, S. 1983). Jeder Organismus besitzt eine Vielzahl an V-Genen und mehrere D- und J-Gene, die die variablen Ketten der Ak codieren. Durch unterschiedliche Kombination der einzelnen Gene entsteht jeweils eine andere variable Domäne, so daß der Organismus letztlich mit relativ wenigen Genen Millionen verschiedener Ak herstellen kann.

##### **1.1.1. B-Zell-Entwicklung**

Die B-Zell-Entwicklung verläuft in mehreren Schritten. Damit die B-Zellen kontrolliert heranreifen und sich differenzieren, sind Zytokine notwendig, die in diese Prozesse regulativ eingreifen.

Ausgangspunkt der B-Zell-Entwicklung ist das Knochenmark (KM). Dort befinden sich die pluripotenten Stammzellen des gesamten hämatopoetischen Systems. Auf ein Signal hin proliferieren die B-Zellen und das Rearrangement der Immunglobulingene beginnt. Die Vorläufer-B-Zelle ist entstanden. Schon hier werden die Oberflächen-Antigene CD19 und CD10 exprimiert (Zola, H. 1987). Über 90% der Blut-B-Lymphozyten besitzen das CD19-Ag.

Zuerst werden die Gene aktiviert, welche die schwere Kette codieren, dabei lagert sich nach dem Zufallsprinzip ein D-Segment mit einem J-Segment zusammen, dann ein V-Segment mit dem DJ-Bereich. Sind die Gene umgeordnet, erfolgt die Transkription unter der Kontrolle von Promotoren und Enhancern. Die schweren  $\mu$ -Ketten akkumulieren im Zytoplasma. In diesem Stadium bezeichnet man die Zelle als Prä-B-Zelle. Im Laufe der weiteren Entwicklung der Prä-B-Zellen finden auf genetischer Ebene die Rearrangements der leichten Kette statt, und zwar zuerst  $V\kappa$  zu  $J\kappa$ , dann  $V\lambda$  zu  $J\lambda$  (Alt, F.W. *et al.* 1987). Wahrscheinlich hat die Zelle hier mehrere Möglichkeiten, um ein intaktes Ig zu bilden: Ist die leichte  $\kappa$ -Kette funktionstüchtig und bindet intrazellulär die schwere Kette, finden keine weiteren Umordnungen statt. Ist dies nicht der Fall, eventuell aufgrund eines unvollständigen Rearrangements oder einer Verschiebung des Leserasters, wird die  $\lambda$ -Kette gebildet und an die schwere Kette gebunden. Das Umordnen geschieht zufällig auf dem mütterlichen oder auf dem väterlichen Chromosom. Durch die vielen Rearrangements der Gene wird die Bindungstasche für Ag nach dem Zufallsprinzip gebildet.

Sind die schweren und leichten Ketten umgeordnet, verlassen die B-Zellen das KM und wandern in die Körperperipherie, vor allem in das Lymphsystem und in die Blutgefäße. In diesem Stadium exprimieren die Zellen IgM und IgD auf ihrer Zelloberfläche.

Nur etwa 5-10% der Zellen, die die B-Zell-Entwicklung eingeschlagen haben, verlassen das KM. Die Zellen, die ihre Immunglobuline nicht vollständig

umordnen, werden eliminiert. Eventuell existiert ein negativer Selektionsmechanismus wie bei den T-Zellen.

Haben die Zellen das KM verlassen, gelangen sie über das Blut in die lymphatischen Organe, wo sie den Kreislauf über die postkapillären Venolen mit hohem Endothel verlassen und so in den Cortex gelangen. In Abwesenheit von Antigen wandern sie durch die primären Follikel und kehren über das lymphatische System in den Kreislauf zurück. In Gegenwart von Antigen werden die B-Zellen durch T-Helferzellen zur Bildung von Primärfoci, bestehend aus proliferierenden Zellen, angeregt. Letztere wandern ab, um Keimzentren von Sekundärfollikeln zu bilden. Das sind Orte schneller B-Zell-Proliferation und ihrer Differenzierung zu Plasmazellen, die wiederum zu den Marksträngen der lymphatischen Organe oder ins KM wandern, wo 90% der Ak produziert werden. Einige B-Zellen besiedeln eine Randzone um die Lymphfollikel herum, eventuell handelt es sich hierbei um anergische Zellen.

### **1.1.2. Einfluß von Zytokinen auf die B-Zell-Reifung**

Wird der Antigen-MHC-Komplex von einer T-Helferzelle gebunden, sezerniert die T-Zelle IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 und IFN- $\gamma$ . Diese Zytokine sind wichtige Wachstumsfaktoren für die B-Zelle, denn sie leiten deren Vermehrung und Differenzierung ein (Gordon, J. und Guy, R. 1987). Neben T-Zell-Produkten sind auch Produkte von Monozyten an der Aktivierung von B-Zellen beteiligt: Das von aktivierten Monozyten sezernierte IL-1 und TNF- $\alpha$  greift in einem sehr frühen Stadium der B-Zell-Aktivierung ein, indem es den Übergang der B-Zellen vom unstimulierten Zustand in den stimulierten vermittelt. Bei der Proliferation der B-Zellen, die durch IL-1, IL-2 und IL-4 induziert wird, kommt es zum Eingriff in den Zellzyklus der B-Zelle.

Bei der Differenzierung der B-Zellen, die nun als reife Plasmazellen vorliegen, durchlaufen die Zellen weitere Immunglobulin-Gen-Umordnungen, die zu einem Klassenwechsel der Immunglobuline führen. Je weiter die Plasmazelle



ausdifferenziert, desto mehr verliert sie die Fähigkeit zur Proliferation. Gleichzeitig kommt es zur Expression wichtiger Differenzierungsmarker auf der Zelloberfläche (CD23, MHC II). Diese Marker sind wichtig für eine Interaktion mit anderen immunkompetenten Zellen. Durch verstärkte MHC II-Expression werden die antigenpräsentierenden Eigenschaften verbessert. Die Differenzierung der B-Zelle wird durch die T-Zell-Produkte IL-2, IL-4, IL-6 und IFN- $\gamma$  reguliert (O'Garra, A. *et al.* 1988).

Die B-Zelle sezerniert nach Stimulation durch die genannten Produkte größere Mengen IgM. Nachfolgend setzen in der B-Zelle, ausgelöst durch Zytokine, weitere Rearrangements ein, die einen Immunglobulin-Klassenwechsel (Isotyp-switching) von IgM zu IgG auslösen. IgM- und IgG<sub>3</sub>-Antworten sind relativ T-Zell-unabhängig, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgE und IgA benötigen Hilfe. Folgende Zytokine können die Ig-Expression beeinflussen: IL4 (IgG<sub>1</sub>, IgE), IL5 (IgA) und IFN  $\gamma$  (IgG<sub>2a</sub>). IL6 kann die Ig-Produktion in stimulierten Zellen erhöhen (Vitetta, E.S. *et al.* 1991).

Außer der antigeninduzierten B-Zell-Aktivierung existieren noch weitere Mechanismen:

Bindung von C3d an seinen Rezeptor CD21 oder Bindung eines Liganden an CD20 oder CD45, eine membranassoziierte Protein-Tyrosin-Phosphatase (Clark, E.A. *et al.* 1991).

PWM (Poke-weed-Mitogen) ist ein geeignetes Mitogen für humane, LPS (Lipopolysaccharid), ein Endotoxin gramnegativer Bakterien, für murine B-Zellen. Auch Ak, die gegen IgM gerichtet sind, können zu einer Aktivierung führen.

### 1.1.3. B-Zell-Gedächtnis

Dem immunologischen Gedächtnis ist es zu verdanken, daß die sekundäre Immunantwort viel schneller in Gang kommt als die primäre. Zum Mechanismus

der Entstehung von B-Gedächtnis-Zellen existieren zwei unterschiedliche Theorien:

Die eine schlägt vor, daß die Vorläuferzellen von Gedächtnis- und Plasmazellen von einer gemeinsamen Zelle abstammen. Die zweite besagt, daß verschiedene Vorläuferzellen für Gedächtnis- und Plasmazellen existieren. Es konnte ein Oberflächenmarker, J11d, gefunden werden, der auf Gedächtniszellen nur in geringer Menge vorkommt (J11d<sup>lo</sup>), im Gegensatz zu primären B-Zellen, die man als J11d<sup>hi</sup>-Zellen bezeichnet (Linton, P. *et al.* 1989).

Bei Gedächtniszellen handelt es sich wohl um kleine ruhende B-Zellen, die man in der Zirkulation finden kann. Sie besitzen dadurch eine lange Lebenszeit, daß sie sich hin und wieder durch Turn-over erneuern, jedoch nur in Anwesenheit von Antigen (Gray, D. 1988). In Abwesenheit von Ag beträgt die Halbwertszeit von Gedächtnispopulationen nur wenige Wochen. Auch hier existieren zwei Hypothesen, die die ständige Anwesenheit von Ag zu erklären versuchen:

Sowohl Plasma- als auch Gedächtniszellen entstehen während einer humoralen Immunantwort in der Milz und in den Lymphknoten. Antikörperproduzierende Zellen entstehen in der periarteriolen lymphatischen Scheide, während sich Gedächtniszellen in den Follikeln entwickeln. Sobald Ak zirkulieren, entstehen Ag-Ak-Komplexe, die zum einen durch das mononukleäre phagozytäre System erkannt und verdaut werden, zum anderen auf zellulären Fortsätzen von follikulären dendritischen Zellen unbeweglich gemacht werden. Gedächtniszellen können jetzt, im Gegensatz zu unreifen B-Zellen, durch diese Immunkomplexe aktiviert werden und besiedeln nach Rezirkulation die periarteriolen lymphatischen Scheiden der Milz und der Lymphknoten, wo sie sich zu Ak-produzierenden Zellen entwickeln (van Rooijen, N. 1990; Vitetta, E.S. *et al.* 1991).

Zur Funktionsbeschreibung der zweiten Hypothese wurde folgendes Modell aufgestellt, das ebenso wie die erste Hypothese davon ausgeht, daß B-Zellen mit dem passenden Ag ständig neu aktiviert werden müssen:

Handelt es sich um persistierende Virusinfektionen, führt die ständige Anwesenheit des Ag immer wieder zu einer B-Zell-Stimulation, was zur Folge

hat, daß die entsprechenden B-Zellen stets vorhanden sind und IgG produzieren. In den meisten Fällen verweilt das Ag allerdings nicht im Organismus. Hier kann das immunologische Gedächtnis mit Idiotypen und Antiidiotypen erklärt werden (Song, C.H. *et al.* 1991; Schlueter, A.J. *et al.* 1992). Antiidiotypen sind Ak, die gegen eigene Ak (Idiotypen) gerichtet sind. Während des Antigenkontaktes kommt es zur klonalen Proliferation der B-Zellen mit dem passenden Ig. Diese Zellen sezernieren nun den Idiotyp IgG, der gegen das Ag gerichtet ist. Gleichzeitig könnte es aber auch B-Zellen geben, deren membranständige Immunglobuline den variablen Teil der Idiotypen binden. Die Immunglobuline solcher Zellen bezeichnet man als Antiidiotypen. Der Idiotyp-Antiidotyp-Komplex wird von der B-Zelle aufgenommen, fragmentiert und zusammen mit MHC-Molekülen auf der Zellmembran präsentiert. Falls eine T-Helferzelle diesen Komplex bindet, stimuliert sie durch Zytokinsekretion die B-Zelle zur Freisetzung von Antiidiotypen und zur Proliferation. Die Antiidiotypen müssen ähnliche Form wie das Ag aufweisen, da sie ja wie das Ag vom Idiotyp gebunden werden. Wenn sie von den B-Zellen mit membranständigen Idiotypen gebunden sind, induzieren sie wiederum deren Aktivierung. Durch diesen Mechanismus werden die Idiotyp- und Antiidiotyp-produzierenden B-Zellen ständig aktiviert und können auf diese Weise überleben, ohne daß das ursprüngliche Antigen im Körper vorhanden ist. Im Falle einer erneuten Konfrontation mit Ag ist bereits das passende Ig vorhanden, um eine effektivere Sekundärantwort einzuleiten.

### **1.2. B-Zellen und Autoimmunerkrankungen**

Autoimmunerkrankungen stellen kein allgemeines Versagen des Immunsystems dar, sondern nur eine spezifische Reaktion gegen ein bestimmtes, körpereigenes Antigen. Deshalb besitzen sie eine ausgesprochen spezifische Pathogenese, da sie eine natürliche Folge des offenen Repertoires an B- und T-Zell-Rezeptoren sind. Für die Entstehung dieser Krankheit sind wahrscheinlich sowohl autoreaktive B- als auch T-Zellen notwendig. Naive

autoreaktive B-Lymphozyten nehmen das Auto-Antigen auf, fragmentieren es in einzelne Peptide und präsentieren diese den autoreaktiven CD4-Z-Helferzellen. Die T-Helferzellen setzen dann Zytokine frei, wie etwa IL-4, die die B-Zellen zur Produktion von Auto-Ak anregen.

Diese Krankheiten können viele verschiedene Gewebe betreffen und auf den meisten der bekannten Mechanismen der Immunabwehr beruhen. Dabei richtet sich der zerstörerische Prozeß allerdings gegen den Körper selbst und nicht gegen einen eingedrungenen Krankheitserreger.

### **1.3.Oberflächen-Antigene der B-Lymphozyten**

Während der B-Zell-Entwicklung ändert sich die Expression der Zelloberflächenmoleküle. In jedem Stadium der B-Zell-Entwicklung des Menschen werden verschiedene Zelloberflächenmarker exprimiert, die sich zur Identifizierung von B-Zellen in spezifischen Entwicklungsstadien heranziehen lassen. Die Funktion der meisten dieser Proteine in den reifen Zellen ist bekannt, doch ihre spezifische Bedeutung für die B-Zell-Entwicklung kennt man noch nicht. So sind CD19, CD21 und CD45 wichtig für die Signalgebung während der B-Zell-Aktivierung. MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren den T-Helfer-Zellen Antigene, und CD40 ist an den Wechselwirkungen zwischen B- und T-Zellen beteiligt. CD10, CD20 und CD38 stellen nützliche Zellmarker während der Entwicklung dar. Obwohl Prä-B-Zellen einige  $\mu$ -H-Ketten an der Zelloberfläche exprimieren, ist gerade die Existenz von intrazellulären  $\mu$ -Ketten für diese Zellen charakteristisch. Reife B-Zellen sind durch das Erscheinen von IgD auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet.

#### **1.3.1. CD19**

Dieses transmembranäre Glykoprotein, das außer auf B-Lymphozyten nur noch auf dendritischen Zellen zu finden ist, wird während der gesamten B-Zell-

Differenzierungs- und Reifungsstadien auf der Zelloberfläche exprimiert, außer auf den Plasmazellen. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der B-Zell-Proliferation.

### **1.3.2. CD22**

Bei diesem Oberflächenantigen handelt es sich um ein Phosphoglykoprotein, das ausschließlich auf B-Zellen vorkommt. Cytoplasmatisches CD22 kommt schon in der Pro- und Prä-B-Zelle vor, die Expression auf der Zelloberfläche korreliert stark mit der von IgD. Es fungiert als Adhäsionsmolekül und spielt eine Rolle bei der B-Zell-Aktivierung.

### **1.3.3. CD23**

CD23 ist der FcεRII (Bonney et al.), gehört zur Lektinfamilie und wird hauptsächlich auf reifen B-Zellen exprimiert. In Tonsillen sind die Zellen der Mantelzone CD23<sup>+</sup>, die im Keimzentrum sind CD23<sup>-</sup>. Aktivierte und EBV-transformierte B-Lymphozyten setzen lösliche CD23-Fragmente durch Spaltung des membrangebundenen Proteins frei (Cairns et al., 1990). Lösliches CD23 spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Regulation der IgE-Antwort über Wechselwirkungen mit CD21.

### **1.3.4. CD40**

Dieses Membranglykoprotein kommt auf peripheren und tonsillären B-Lymphozyten vor, jedoch nicht mehr in ausdifferenzierten B-Zellen. Schon 1986 konnte gezeigt werden, daß ein monoklonaler Ak gegen CD40 die B-Zellen in die S-Phase des Zellzyklus treiben kann, was den Effekt eines Wachstumsfaktors imitiert (Clark et al., 1986). Die Vernetzung des CD40-

Moleküls in Zusammenarbeit mit IL-4 kann B-Zell-Proliferation hervorrufen. Vermutlich ist CD40 ein Rezeptor für einen zellulären Liganden oder für einen löslichen Faktor, der die Proliferation auslösen kann.

### **1.3.5. CD69**

Bei diesem Glykoprotein handelt es sich um ein Dimer, das in der frühen Lymphozyten-Aktivierung eine Rolle spielt.

### **1.3.6. CD126**

Dieses Oberflächenmolekül kommt auf aktivierten B-Zellen, Plasmazellen und Epithelzellen vor. Es handelt sich um die alpha-Untereinheit des IL-6-Rezeptors.

### **1.3.7. CD4**

Dieses transmembranäre Glykoprotein wird als Monomer auf peripheren T-Zellen, auf Thymozyten und auf Monozyten exprimiert. Es hat zwei wichtige Aufgaben zu erfüllen: erstens fungiert es als Adhäsionsmolekül, um die Zell-Zell-Interaktionen zwischen den MHC II der APCs und den T-Zellen zu stabilisieren, und zweitens spielt es eine Rolle bei der Signaltransduktion, die durch Wechselwirkungen des T-Zell-Rezeptors mit einem Antigen ausgelöst wird.

### **1.3.8. CD8**

Die Struktur des CD8-Moleküls variiert je nach Entwicklungsstadium der Zellen. Auf peripheren humanen T-Lymphozyten liegt es entweder als Homodimer  $CD8\alpha$  vor oder als Komplex aus mehreren  $CD8\alpha$  oder aus  $CD8\alpha$  und  $CD8\beta$ . Die Aufgaben dieses Moleküls sind die gleichen wie die des CD4-Moleküls, wobei es aber zur Bindung zwischen CD8- und MHC I-Molekülen kommt. Man findet dieses Molekül auch auf Untergruppen der NK-Zellen.

### **1.3.9. CD14**

Man findet dieses Oberflächenmolekül stark exprimiert auf Monozyten, aber auch auf interfollikulären Makrophagen, retikulären dendritischen Zellen und auf Langerhans-Zellen. Es handelt sich um ein Zelloberflächen-Rezeptor für LPS-Komplexe und LPS-bindendes Protein.

### **1.3.10. CD56**

Dieses Polypeptid kommt auf humanen NK-Zellen und auf einigen T-Zell-populationen vor. Seine Funktion ist unbekannt.

### **1.3.11. CD83**

Bei diesem Molekül handelt es sich um ein Protein, das auf dendritischen Zellen, Langerhans-Zellen und interdigitierenden Retikulumzellen exprimiert wird. In geringer Menge findet man es auch auf B-Lymphozyten des Keimzentrums. Vermutlich spielt es eine Rolle bei der Antigenpräsentation, Zell-Zell-Interaktionen und der darauffolgenden Aktivierung.

### 1.4. Influenza -Viren

Die Influenza, eine akute virale Erkrankung des Respirationstraktes, ist durch eine hohe Ansteckungsrate und über die Jahrhunderte hinweg häufiges Auftreten in Form einer Epidemie gekennzeichnet. Die Epidemien variierten in ihrer Ausprägung und führten meist zu einer hohen Mortalität der älteren Bevölkerung. In diesem Jahrhundert nahm die "Spanische Influenza", die sich von 1918-1919 pandemisch ausbreitete, zwischen 20 und 40 Millionen Menschen das Leben. 1933 wurden erstmals Influenza-Viren menschlicher Herkunft als verursachende Erreger der "Echten Grippe" isoliert (Smith, W. *et al.* 1933).

#### 1.4.1. Nomenklatur und Einordnung des Virusstammes A/PR/8

Influenza-Viren gehören zur Gruppe der Orthomyxoviren, die ihren Namen aufgrund von Interaktionen mit Mukopolysacchariden und Glykoproteinen, insbesondere Sialinsäuren auf Schleimhäuten (Mucus), erhielten. Man teilt die Influenza-Viren in die Typen A, B und C gemäß bestimmter Strukturunterschiede des Nukleoproteins (NP) und Matrix-Proteins (MP) ein. Influenza A-Viren werden weiterhin in Subtypen unterschieden, die mit einer Nomenklatur bestehend aus: Typ/ ursprünglicher Wirt/ geographischer Ursprung/ Stammnummer/ Jahr der Isolierung bezeichnet werden. So bedeutet die Signatur A/PR/8/34, daß es sich um ein Influenza A-Virus handelt, welches erstmals 1934 in Puerto Rico isoliert worden war. Bei Stämmen, die humanen Ursprungs sind, entfällt die Wirtsbezeichnung. Oftmals werden Kürzel, die eine



antigene Beschreibung der Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) darstellen angefügt, z.B. bei APR/8 (H1N1).

### **1.4.2. Charakterisierung und Morphologie**

Im Gegensatz zu den Influenza-Typen B und C ist Influenza Typ A nicht nur humanpathogen, sondern kann aus vielen anderen Tierarten isoliert werden. Influenza A-Viren sind pleomorphe Negativstrang-RNA-Viren mit einer Größe von 80-120 nm.

Die Viren besitzen eine Phospholipidmembran, die das segmentierte Genom in Form von acht linearen Einzelstrang-RNA-Molekülen umgibt. Insgesamt codiert das Genom für zehn Proteine. Zusammen mit dem Nukleoprotein (NP) und den drei Polymerasen PB1, PB2 und PA liegt das Genom als Nukleoprotein-RNA-Polymerasekomplex vor. Die Polymerasen sind hochkonservierte Proteine, die die virale Negativ-Strang-RNA in positiv orientierte mRNA bzw. in neue Virionen-RNA negativer Orientierung umschreiben. Sie akkumulieren im Zellkern, wo sie ihre enzymatische Aktivität entfalten.

Als basisches Protein bildet das Nukleoprotein das Rückgrat für den helikalen Nukleokapsid-Komplex und ist außerdem an der Transkription und Replikation der Virus-Partikel beteiligt. Das Nukleokapsid wird im Virion von Matrix-Proteinen (M) umgeben. Dabei handelt es sich um zwei unglykosilierte Proteine, die mit der Virushülle verbunden sind. M1 ist ein Strukturprotein, das fest mit der Membranhülle verbunden ist und in unmittelbarer Nähe zu den Oberflächen-Proteinen und dem Polymerase-Komplex vorliegt. Das M2-Protein stellt ein integrales Membran-Protein dar und wird in großer Menge auf der Oberfläche von infizierten Zellen gefunden. An die Matrix-Proteine schließt die ursprünglich von der Wirtszelle stammende Hülle an, die zwei Typen virusspezifischer Glykoproteine (HA,NA) in Form von Spikes enthält.

Das Hämagglutinin macht 25% der viralen Proteine aus und liegt als Trimer gleichmäßig auf der Oberfläche des Virions verteilt vor. Die drei Monomere müssen durch proteolytische Spaltung in die Polypeptide HA1 und HA2 über-

führt werden, um dem Virion Infektiosität zu verleihen. Wirtszellen, die keine spaltenden Enzyme besitzen, entlassen Virionen, die nur geringfügig infektiös sind. HA2 besitzt helikale Form und dient mit seinen zwei hydrophoben Enden zum einen der Verankerung des Moleküls in der Virusmembran (C-Terminus), zum anderen der Fusion mit der Wirtszelle (Fusionspeptid am N-Terminus). HA1 ist von globulärer Gestalt und bildet am distalen Ende die Rezeptorbindungsstelle für Sialinsäurereste in Form einer Tasche. Die Antigenität von HA ist entscheidend für Wirtsspezifität und Gewebeverteilung.

Die Neuraminidase, das zweite Oberflächenprotein von Influenza A-Viren, besteht aus einer einzigen Polypeptidkette. Diese setzt sich aus einem enzymatisch aktiven tetrameren Kopf und einem zentralen Stiel, der mit seinem hydrophoben Ende (N-Terminus) zur Verankerung dient, zusammen. Die Verteilung ist nicht gleichmäßig, sondern in Form von "Flecken" auf der Oberfläche konzentriert. Es wird vermutet, daß NA am Zusammenbau der Viren in der Wirtszelle (assembly) und der Freisetzung (budding) mitwirkt. Außerdem hilft sie bei der Durchdringung der Schleimbarriere im Respirationstrakt.

Bei den beiden nichtstrukturellen Proteinen (NS1, NS2) handelt es sich um viruscodierte Proteine, die ausschließlich in der Wirtszelle, jedoch nicht im Virion selbst vorkommen. NS1 wird früh während einer Infektion gebildet. NS2 entsteht erst später im Infektionsverlauf und häuft sich ebenso wie NS1 im Zellkern an (Fields, B.N. Kapitel: Orthomyxoviruses 1990).

### **1.4.3. Infektion und Replikation**

Die Adsorption der Influenza-Viren an sensitive Zellen wird über die Bindungsstelle im HA1 mit sialinsäurehaltigen Proteinen oder Lipiden auf der Oberfläche der Wirtszelle vermittelt. Nach rezeptorvermittelter Endozytose gelangt das Virus schließlich in ein Endolysosom, in dem das innere Milieu angesäuert wird (pH 5). Dies führt zur Konformationsänderung des HA2 und zur Freilegung des Fusionspeptides. Bei der Penetration verschmelzen virale und zelluläre Membran, wodurch das Nukleokapsid in das Zytoplasma gelangt. Unter Mithilfe von

M2 wird die RNA freigesetzt (uncoating), indem die Nukleoproteine durch pH-Erniedrigung abgetrennt werden. Im Zellkern findet die Transkription der acht viralen Negativ-Strang-RNA-Moleküle in von der Zelle transkribierbare mRNA (+Strang) statt. Die Transkriptase, ein Komplex aus viruseigenen Polymerasen (PB1, PB2 u.a.), ist bereits im Virion enthalten. Der initiale Schritt der Transkription des viralen Genoms benötigt einen Primer. Dazu wird das von zellulärer RNA-Polymerase II synthetisierte 5'Cap-Ende wirtseigener mRNA von einer viruscodierten Endonuklease entfernt und verwendet. Nach Elongation kann die fertig synthetisierte mRNA im Zytoplasma zur Proteinsynthese dienen. Der nötige Enzymapparat für die Replikation des viralen Genoms setzt sich aus den Polymerasen PA, PB1 und dem Nukleoprotein zusammen. Hierbei spielen wahrscheinlich auch NS1 und NS2 eine Rolle. Die Translation der Spike-Proteine HA und NA geschieht am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Glykosylierung findet im Lumen des ER statt und wird im Golgi-Apparat weitergeführt bzw. modifiziert. Über Einbau der Golgi-Vesikel in die Zellmembran infolge des ständigen Membranflusses formen sich dort Bereiche der entstehenden Virushülle. Die übrigen Virusproteine werden an freien Ribosomen synthetisiert. Das NP wandert in den Zellkern, wo sich das Nukleokapsid zusammenlagert. Man vermutet eine zufällige Selektion der Gensegmente, bei der jedem Virion mindestens eine Kopie jedes Gens zugeteilt wird. Die M-Proteine lassen sich an der Innenseite virusproteinhaltiger Membranregionen nachweisen. Sie haben die Funktion, beim Zusammenbau des Virions Kontakt zwischen den viralen Glykoproteinen in der Membran und dem Nukleokapsid zu vermitteln. Besonders M1 bindet den aus dem Zellkern wandernden Nukleokapsid-Komplex. Die Abknospung der Viruspartikel (budding) am apikalen Ende der Epithelzellen wird durch enzymatische Aktivität der NA unterstützt. Durch Entfernung sämtlicher Sialinsäurereste in der Umgebung des sich formenden Virions wird eine Aggregation der Viruspartikel sowie ein Anhaften an der zu verlassenden Wirtszelle verhindert (Fields, B.N. Kapitel: Orthomyxoviridae and their replication 1990).

#### **1.4.4. Antigendrift und Antigen shift**

Aufgrund der starken antigenen Variation der glykosylierten Hüllproteine NA und HA treten veränderte Antigene auf. Dies führt dazu, daß sich das Immunsystem mit ständig neuen Influenza-Varianten auseinandersetzen muß. Besonders Abwandlungen der antigenen Determinanten des HA-Moleküls sind die Grundlage für die rekurrierenden Influenza-Epidemien, da lediglich Antikörper gegen dieses Glykoprotein vollständigen Schutz vor einer Infektion bieten. Die unter anderem durch Punktmutation ausgelösten Strukturänderungen in dem HA- bzw. NA-Gen von Influenza-Viren bezeichnet man als Antigendrift. Von Antigen shift spricht man, wenn es durch Doppelinfektion einer Zelle mit Influenza-Viren unterschiedlicher Antigenstruktur zum Austausch von Genen zwischen den RNA-Segmenten kommt (genetische Reassortion). Die daraus entstehende Variation der Antigenstruktur trägt ebenfalls zum epidemiologischen Verhalten von Influenza-Viren bei. Dieses Ereignis ist aufgrund des segmentierten Genoms weitaus häufiger als das traditionelle Konzept der genetischen Rekombination.

#### **1.4.5. Pathogenität**

Die Verbreitung von Influenza-Viren geschieht über winzige Aerosole, die in den Respirationstrakt eindringen. Das Virus infiziert die Mukosa des oberen Respirationstraktes und gelangt bis in die Lungen. Das Spektrum der Erkrankung reicht von einer asymptomatischen Infektion bis hin zu einer viralen Pneumonie, die zum Tode führen kann (Stuart-Harris, C.A. 1961). Die Inkubationsphase reicht von 24 h bis hin zu 5 Tagen, je nach Virusdosis und Zustand des Immunsystems, im Durchschnitt jedoch drei Tage. Das typische, unkomplizierte Influenza-Syndrom äußert sich in einer Tracheobronchitis. Gewöhnlich sind bei Ausbruch der Erkrankung Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost mit folgendem hohem Fieber, ein rauher Husten und allgemeines Unwohlsein zu verzeichnen. Husten, Schnupfen und Rachenentzündung folgen meist und

können sich intensivieren, wenn um den dritten Tag der Erkrankung das Fieber zurückgeht. Dauerhafte Schäden der Lunge sind bei einer unkomplizierten Influenza nicht zu erwarten. Bei Kindern kommen Symptome wie gastrointestinale Beschwerden, Krupp, Myositis-Beschwerden, Mittelohrentzündung sowie hohes Fieber mit Krampfneigung hinzu.

Der durch Virusinfektion weitgehende Verlust der mukoziliären Schicht führt oftmals zu sekundären bakteriellen Pneumonien. Kombinierte viral-bakterielle Pneumonien treten dreimal häufiger auf als die rein virale Pneumonie. Besonders *Streptococcus pneumoniae* und *S. aureus*, sowie *Haemophilus influenzae* treten am häufigsten auf (Schwarzmann, S.W. *et al.* 1971). Bakteriell sezernierte Proteasen, die durch Spaltung des HA zur Steigerung der Infektiosität von Influenza-Viren führen, spielen so eine synergistische Rolle bei einer Pneumonie. Neben dem pulmonaren System können auch andere Organe von der Influenza betroffen werden. Myoperikarditis, Myositis, Encephelopathie und das endotoxinbedingte Syndrom des toxischen Schocks wurden mit Influenza A in Verbindung gebracht.

Eine Infektion verläuft immer akut. Für Persistenz bzw. latente Infektionen gibt es keine Hinweise. Besonders bei Kindern und Senioren, den empfänglichen Gruppen für Influenza, kann es zu hohen Mortalitätsraten kommen.

### **1.4.6. Immunantwort gegenüber Influenza A-Viren**

Die viralen Oberflächenproteine werden zuerst vom Immunsystem erkannt. Die Immunantwort während einer akuten Influenza-Infektion wird sowohl von einer spezifischen zellulären Antwort als auch durch die Produktion von Antikörpern gegen die Glykoproteine geprägt. B-Lymphozyten werden durch Lymphokine der T-Helfer-Zellen zur Antikörperproduktion angeregt.

Influenza A-induziertes Interferon wird einen Tag nach der Infektion im Serum und Respirationstrakt gefunden und dient auf humoraler Ebene der ersten Abwehr. Ab dem 7. Tag verleiht vor allem lokal produziertes IgA Schutz für die nasalen Schleimhäute. Wie auch bei den Immunglobulinen im Serum (IgG,

IgM), können nur Antikörper gegen HA und in geringerem Maße gegen NA die Infektiosität des Virus herabsetzen. Sie verhindern die Adsorption der Viren und fördern die Aggregation der Partikel. Damit werden sie für phagozytierende Zellen wie Makrophagen opsoniert (Fc-Rezeptor) und für die komplementvermittelte Lyse auf der Zelloberfläche vorbereitet. Ak gegen HA und NA sind Hauptfaktoren der Resistenz. Die eher kurzlebigen zytotoxischen T-Zellklone beenden die akute Infektion. Selbst nach Impfungen steigt die Zahl der zytotoxischen T-Zellen nur um 5% (Diepersloot, R.J. 1989).

Als Prophylaxe und Therapeutikum wird Amantadin gegen sämtliche Influenza A-Subtypen eingesetzt. Die antivirale Wirkung richtet sich gegen das M2-Protein, aber auch gegen HA.

Impfviren werden in Hühnereiern vermehrt und mit Formalin inaktiviert. Die daraus gewonnenen Impfstoffe können eine eventuelle Erkrankung abmildern.

## **1.5. Zytokine**

### **1.5.1. Interferone**

#### **1.5.1.1. Interferon- $\alpha$ und - $\beta$**

Interferone wurden bereits 1957 entdeckt und werden von fast allen Zellen als Antwort auf eine Virusinfektion gebildet, eine Ausnahme machen die Nervenzellen. Man unterscheidet Typ I Interferone (IFN- $\alpha/\beta$ ), die schwerpunktmäßig antiviral wirken, vom Typ II Interferon (IFN- $\gamma$ ), welches hauptsächlich immunregulatorische Wirkung besitzt. IFN- $\alpha/\beta$  werden durch Virusinfektion oder dsRNA induziert und zeichnen sich durch Stabilität bei pH 2 aus. IFN- $\alpha$  stammt aus Leukozyten. Bisher wurden 24 verschiedene bis zu 80% homologe Subtypen gefunden, darunter ein säurelabiles. IFN- $\beta$  ist das Hauptinterferon nicht-leukozytärer Zellen wie z.B. Fibroblasten, wird aber auch von Leukozyten gebildet.

Außer der Fähigkeit, virale Replikation zu inhibieren, besitzen die Typ I-Interferone die Möglichkeit, Zell-Proliferation zu hemmen, sie erhöhen in NK-Zellen das Lysepotential und modulieren die MHC-Molekül-Expression.

### 1.5.2. Interleukine

Als Interleukine bezeichnet man eine Gruppe hormonartiger Peptide, die regulatorische Signale zwischen Zellen vermitteln. Sie entfalten ihre Wirkung durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor auf Zielzellen. Die nachfolgende Expression von Proteinen nimmt Einfluß auf das Zellwachstum und die Differenzierung und besitzt immunregulatorische Funktion. Man unterscheidet zwischen Monokinen, die von Makrophagen und Monozyten produziert werden und Lymphokinen, die lymphozytären Ursprungs sind.

#### 1.5.2.1. IL-4

IL-4 wurde hauptsächlich als B-Zell-Wachstumsfaktor bekannt. Es wird vorwiegend von der  $T_H1$ -Subpopulation und von Zellen der Mastzellreihe produziert und hat vielfältige Wirkungen (Yokata, S. *et al.* 1988). Auf B-Zellen wird die Expression von MHC II-Antigen gesteigert, wodurch die antigenpräsentierende Wirkung gefördert wird. Auf diese Weise wird möglicherweise die klonale Expansion spezifischer B-Zellen unterstützt, und das Immunsystem kann auch auf niedrige Konzentrationen von Antigenen ansprechen. Zudem wird der Fc-Rezeptor für IgE auf B-Zellen und Monozyten verstärkt exprimiert. Als ein Hauptregulator der Ig-Isotypen-Expression unterstützt IL-4 das Umschalten von IgG<sub>2/3</sub> zu IgE und IgG<sub>1</sub> und ist damit bei der Ausprägung einer Allergie beteiligt. Auf T-Zellen wirkt IL-4 als (Ko)mitogen, ebenso auf Vorläufer hämatopoetischer Zellen und Mastzellen. Zytotoxische Funktionen in Makrophagen werden aktiviert sowie die Expression von MHC Klasse II-Antigen vermehrt, wodurch sie verstärkt Antigen präsentieren können.

IL-4 antagonisiert die von IL-2 ausgelösten Effekte in B-Zellen und führt zu einer langsamen Abnahme der IL-2-Rezeptoren auf den Zellen. Die Wirkung von IL-4 auf B-Zellen wird wiederum durch das IFN- $\gamma$  inhibiert.

### **1.5.2.2. IL-5**

Dieses Zytokin wird von aktivierten CD4-Zellen und Mastzellen ausgeschüttet. Es wirkt synergistisch mit anderen Zytokinen, wie z.B. IL-2 und IL-4, um Wachstum und Differenzierung von B-Zellen zu stimulieren. Außerdem fördert es in reifen B-Lymphozyten die IgA-Synthese

### **1.5.2.3. IL-6**

IL-6 ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin, welches auf eine Vielfalt von Zielzellen Einfluß hat. Produziert wird es in vielen Zellen einschließlich der T- und B-Zellen, Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten, in denen es durch Stimuli wie TNF, IL-1, PAF (platelet activation factor), Mitogene, LPS und Antigen induziert wird. Aber auch Tumorzellen können IL-6 produzieren und besitzen einen IL-6-Rezeptor. Als B-Zell-stimulierender Faktor bringt es bereits aktivierte B-Zellen zur Ausdifferenzierung und Ig-Sekretion. In Hepatozyten induziert IL-6 die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen und unterstützt somit die Entzündungsreaktion. Zusammen mit IL-1 wirkt es mitogen auf T-Zellen. IL-1, TNF und IL-6 zeigen einige überlappende biologische Aktivitäten (Wong,G.L.*et al.* 1988).

### **1.5.2.4. TNF- $\alpha$ , - $\beta$**

TNF wurde erstmals als Faktor beschrieben, der zu hämorrhagischen Nekrosen in Tumoren führt (Carswell,E.A. *et al.*1975). Später wurde entdeckt, daß es sich bei dem unabhängig davon gefundenen Cachectin, einem zirkulierenden Faktor während parasitärer Infektionen, ebenfalls um TNF handelt.



Neben TNF- $\alpha$ , das hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen gebildet wird, gibt es das TNF- $\beta$  (Lymphotoxin), welches aus Lymphozyten und NK-Zellen stammt. Lymphotoxin besitzt trotz einer Homologie von nur 28% gleiche biologische Aktivitäten wie TNF- $\alpha$  und bindet an denselben Rezeptor (Shalaby, M.R. *et al.* 1985). TNF kann Zellen auch prophylaktisch vor Virusinfektionen schützen.

### 1.5.2.5. Interferon- $\gamma$

IFN- $\gamma$ , auch Immuninterferon oder Typ II-Interferon genannt, wird während einer Immunreaktion von Antigen- oder Mitogen-stimulierten T- und B-Zellen gebildet und ist bei pH 2 labil.

Die biologischen Aktivitäten der Interferone sind weitreichend: Sie etablieren in Zellen einen antiviralen Zustand durch Hemmung der Virusreplikation, inhibieren die Zellproliferation, hemmen oder unterstützen die Zelldifferenzierung und haben immunregulatorische Wirkung. Sie induzieren zahlreiche Proteine und greifen in den Zellmetabolismus ein. Der antivirale Zustand entsteht durch Induktion von Enzymen, die die virale Proteinsynthese hemmen. Dazu zählen eine Proteinkinase, die den Proteinsynthese-Initiationsfaktor eIF2 phosphoryliert und damit blockiert, sowie eine 2'-5'Oligo(A)-Synthetase. Diese aktiviert eine RNase, die zelluläre und virale RNA abbaut. Die Transkription von Influenza-Genen wird durch Mx-Proteine blockiert, die durch Typ I-Interferone induziert werden (Staeheli, P. *et al.* 1984). Gegen andere Viren können Mx-Proteine keine Resistenz verleihen. Die wichtigsten immunologischen Effekte betreffen die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen, wobei die bakteriziden Fähigkeiten durch die Expression gesteigert werden. Als 'priming' Signal macht IFN- $\gamma$  vermutlich Makrophagen für weitere stimulatorische Signale empfänglich, z.B. für TNF- $\alpha$  und IL-1. NK-Zellen werden ebenfalls in ihrer zytotoxischen Funktion gesteigert. Bei der Entstehung von zytotoxischen T-Zellen spielt IFN- $\gamma$  eine Rolle, indem

die Expression von MHC-I- und MHC-II-Antigenen gesteigert wird. In B-Lymphozyten wird die Umschaltung zum Isotyp IgG<sub>2</sub> gefördert, diesbezüglich ist IFN- $\gamma$  ein Gegenspieler zu IL-4. Im Synergismus mit TNF- $\alpha$  besitzt IFN- $\gamma$  bedeutende antitumoröse Wirkung.

### **1.6. Chemokine**

#### **1.6.1. IL-8**

IL-8 wurde , neben der Isolierung aus Psoraisis-Schuppen, in vitro erstmals aus den Kulturüberständen humaner Monozyten isoliert (Walz et al.,1987). Das Protein wird nach Abspaltung einer Signalsequenz von 20 AS am N-terminalen Ende sezerniert (Yoshimura et al., 1989). Hauptproduzenten von IL-8 sind Monozyten und Makrophagen. Daneben konnte IL-8 inzwischen aus einer Vielzahl von Zellen isoliert werden (Baggilioni et al., 1994 und Oppenheim et al., 1991).

#### **1.6.2. MCP-1**

Das Monozyten Chemotaktische Protein-1 (MCP-1) wurde erstmals 1989 aus humanen Blutmonozyten isoliert (Yoshimura et al., 1989) und „Monocyte Chemotactic and Activating Factor“ (MCAF) genannt (Matsushima und Oppenheim, 1989). Das Protein zeigt eine 21 %ige Homologie zu IL-8 auf der Ebene der AS. Inzwischen sind vier weitere Monozyten Chemotaktische Faktoren isoliert worden: MCP-2 aus sktivierten T-Zellen, MCP-3 aus Osteosarkomzellen und, erst kürzlich beschrieben, MCP-4 und -5.

### **1.6.3. MIP-1 $\alpha$ und MIP-1 $\beta$**

Die cDNA des humanen „Monocyte Inflammatory Protein-1 $\alpha$ “ wurde unter dem Namen LD-78 aus der mRNA stimulierter Tonsillarlymphozyten isoliert (Obarn et al., 1986). Seine Homologie zu MCP-1 auf der Ebene der AS beträgt 39%. MIP-1 $\alpha$  wird vorwiegend von B- und T-Lymphozyten produziert. Dagegen wird das nah verwandte MIP-1 $\beta$  vorwiegend von Monozyten gebildet. MIP-1 $\alpha$  kann durch verschiedene Stimuli allerdings in fast allen Zellen exprimiert werden. Ein drittes MIP-1-Protein (MIP-1 $\gamma$ ) ist in BALB/c-Mäusen aus dendritischen Zellen isoliert worden (Mohamadzadeh et al., 1996).

## **1.7. Apoptose**

Mit Apoptose wird der programmierte Zelltod der Zellen beschrieben, der als aktiver, genkodierter Prozess der Zell-Selbstzerstörung meist biologisch sinnvolle homöostatische Funktion hat (Kerr 1991). Dieser programmierte Zelltod spielt eine zentrale Rolle in vielen grundlegenden biologischen Prozessen (Fesus et al., 1991): Metamorphose, embryonale Entwicklung, hormonbedingte Gewebsveränderungen (z.B. in der Prostata, Mamma, etc.), Entwicklung des peripheren Nervensystems, physiologische Erneuerungsprozesse (z.B. in der Haut, Darmepithel, etc.), Hämatopoese, Immunsystem: klonale Selektion, Transplantatabstoßung, Elimination von potentiell schädlichen Zellen wie mutierten oder virusinfizierten Zellen u.v.a.m.

### **1.7.1. Bcl-2 und bcl-x**

Als erstes Mitglied der Bcl-2-Familie wurde das bcl-2-Gen ursprünglich in humanen follikulären B-Zell-Lymphomen entdeckt. Das Protein wurde verstärkt in Geweben nachgewiesen, in denen die Apoptose physiologischerweise vorübergehend unterdrückt wird (Knochenmarkszellen, Melanozyten,

Basalzellen der Haut, etc.) (Fesus et al., 1991). Das bcl-2 und seine homologen Gene (bcl-x, bax, bak, u.a.) sind maßgeblich an der Regulation der Effektorphase des programmierten Zelltodes beteiligt (Reed, 1994; Cory, 1995). Hierbei üben einige Mitglieder der bcl-2-Genfamilie apoptoseinhibierende Funktion (z.B. bcl-2, bcl-x<sub>l</sub>) aus, andere zeigen apoptosefördernde Eigenschaften (z.B. bcl-x<sub>s</sub>).

### **1.8. Zielsetzung**

Bisher wurde angenommen, daß B-Lymphozyten zwar auf viele externe Signale anderer Zellen reagieren, aber selbst wenig an der Zytokinkaskade zur Übermittlung von Informationen beitragen können. Inzwischen ist über die Zytokin- und Chemokin-Expression und auch -Freisetzung in humanen B-Lymphozyten einiges bekannt, so daß man annehmen darf, daß diese Zellen mehr Fähigkeiten und deshalb wohl auch mehr immunmodulatorischen Einfluß besitzen, wenn auch vielleicht nur in ihrer Mikroumgebung, als man bisher angenommen hat.

Um dieses noch sehr neue Feld der B-Zell-Forschung etwas näher zu beleuchten, war das Ziel dieser Arbeit zum einen, die direkten Wechselwirkungen zwischen Influenza A-Viren und humanen B-Lymphozyten zu untersuchen. Dazu gehören die Infizierbarkeit der Zellen durch die Viren einschließlich deren Vermehrung und die Vitalität und Stoffwechselleistung der B-Lymphozyten nach einer Infektion. Zum andern sollten Reaktionen der Zellen auf die Influenza-Infektion untersucht werden, um festzustellen, ob B-Lymphozyten nur als reagierende Zellen eine Rolle spielen oder selbst ins Geschehen eingreifen können. Dazu wurde die Zytokin- und Chemokin-Synthese näher betrachtet. Auch wurde untersucht, ob die Zellen durch die Infektion aktiviert wurden, was durch Expression bestimmter Oberflächen-Antigene äußerlich sichtbar wird und ob sie dadurch in die Apoptose getrieben werden.

## 2.1. Material

### Firmennamen

Amersham	Braunschweig
Becton Dickinson	Heidelberg
Behringwerke AG	Marburg
Biochrom	Berlin
Biomar	Marburg
Boehringer Ingelheim	Ingelheim
Boehringer Mannheim	Mannheim
BMG LabTechnologies	Offenburg
DAKO	Dänemark
Dianova	Hamburg
Dynatec Laboratories	Denckendorf
Eppendorf	Hamburg
GIBCO BRL	Eggenstein
Greiner	Frickenhausen
Hecht	Stadtrade
ICN	Meckenheim
Merck	Darmstadt
MWG BIOTECH GmbH	Ebersberg
Pharmingen	Hamburg
Promega	Mannheim
Qiagen	Hilden
RD Systems	Wiesbaden-Nordenstadt
Riedel de Haen	Seelze
Roth	Karlsruhe
Serva	Heidelberg
Sigma	Deisenhofen
Vector	Wiesbaden

### 2.1.1. Medium und Geräte

### Medium und Zusätze:

RPMI 1640	Biochrom
Trypsin	Biochrom
L-Glutamin	Biochrom
Na-Pyruvat	Biochrom
HEPES	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Bicarbonat	Biochrom
nichtessentielle Aminosäuren	Biochrom

Sämtliche verwendeten Zellsysteme wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, das mit verschiedenen Zusätzen supplementiert wurde.

### RPMI mit Zusätzen:

L-Glutamin	200 mM	5 ml
Natriumpyruvat	100 mM	5 ml
HEPES-Pufferlösung	1 mM	5 ml
Penicillin/ Streptomycin	10000U/ 10000Mg/ml	5 ml
nichtessentielle Aminosäuren	100 x	5 ml

### Geräte:

Die Zellkulturen wurden als offenes System in einem CO<sub>2</sub>- Auto-Zero-Brutschrank von Heraeus bei 37°C, ca. 80% relativer Luftfeuchte und Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. MDBK-Zellen wurden im geschlossenen System unter sonst gleichen Bedingungen inkubiert.

Die Zellkultur- und sonstigen sterilen Arbeiten wurden in einer Laminar-Flow-Box (HLB 2448, Heraeus, Hanau) durchgeführt.

Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Tisch-Zentrifuge (Hettich-Rotanta/ RP Rotor, max. 4000 Umdrehungen/min; Hettich, Tuttlingen) durchgeführt.

ELISA-Bestimmungen wurden im Plattenphotometer Dynatec MR 7000 der Firma Dynatec mit den entsprechenden Filtern durchgeführt.

### 2.1.2. Zellen und Zelllinien

MDCK II-Zellen stammen aus dem Nierenepithel eines Cocker-Spaniels und werden seit 1958 im Labor gezüchtet. Sie sind nur wenig trypsinempfindlich, so daß diese Protease für bestimmte Untersuchungen den Zellkulturüberständen zugesetzt werden konnte, ohne den Zellen in einem Plaquetest zu schaden.

MDBK-Zellen (Madin and Darby Bovine Kidney): Die Zellen stammen von der Niere eines ausgewachsenen Stieres. Seit 1957 werden sie im Labor als permanente Zelllinie gehalten (Proc.Soc. Exp. Biol. Med. 98: 574,1958). Sie werden im Bioassay zum Nachweis von IFN- $\alpha/\beta$  eingesetzt.

HeLa-Zellen: Hier handelt es sich um eine adhärent wachsende permanente Zelllinie, die aus einem humanen Zervixkarzinom gezüchtet wurde (J. Exp. Med. 103: 273-284,1956). Wegen ihrer Fähigkeit, nach Virusinfektion Plaques zu bilden, werden sie in Bioassays verwendet (J. E. Darnell, Jr. und T. K. Sawyer, Virology 8: 223-229,1959).

Den MDCK II-Zellen wurde zusätzlich noch 5% inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), den HeLa- und MDBK-Zellen 10% FCS zugesetzt.

IM-9-Zellen: Diese Zellen wurden erstmals 1967 aus einer Knochenmarksprobe einer Patientin mit multiplem Myelom (Ann.N.Y.Acad. Sci 190:221.234, 1972) in vitro kultiviert. Die Zellen exprimieren verschiedene Oberflächenmarker und Rezeptoren, die charakteristisch für B-Lymphoblasten sind. Außerdem können sie Ig synthetisieren (Nature 251:443-444, 1974). Es wurde gezeigt, daß sie Rezeptoren für humane Wachstumshormone, Insulin und Calcitonin besitzen (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 84-88, 1974 und J. Biol. Chem. 249: 1661-1667, 1974). In eigenen Versuchen wurde gezeigt, daß diese Zellen in der

Lage sind, die Zytokine TNF- $\beta$ , IL-10 und die Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , GRO und RANTES zu produzieren, nicht jedoch TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und MCP-1.

Raji-Zellen: Die Zellen dieser Linie wurden 1963 aus der linken Maxille eines Burkitt-Lymphoms eines 11 jährigen Schwarzen isoliert. Es handelt sich um lymphoblastenähnliche Zellen, die resistent gegenüber VSV-Viren sind.

Die CD19-positiven B-Lymphozyten wurden aus humanen Tonsillen isoliert. Sie wurden in RPMI<sup>suppl</sup> mit 10% Serumzusatz kultiviert.

### 2.1.3. Influenza Viren

Die verwendeten Influenza A-Viren wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk, Institut für Virologie in Marburg, zur Verfügung gestellt.

#### Influenza-A-Stämme:

A/PR/8	H1N1
A/Duck/Alberta/35/76	H12N5
KP/FPV/Rostock/34	H7N1
TUR/Turkey/England/63	H7N3
A/Singapore/1/57	H2N2
N/Duck/Germany/49	H10N7

### 2.1.4. Chemikalien, Reagenzien, Kits

Aceton	Merck
Acrylamid	Roth
Agarose Typ L	Behringwerke
Agarose (Elektrophorese)	GIBCO BRL
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ammoniumacetat	Merck



## Material und Methoden

---

Bisacrylamid	Roth
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
CDP Star	Biochrom
Coomassieblau	Sigma
Corbidbalsam	Hecht
Desoxycholsäure	Sigma
Diaminobenzidin	Sigma
EDTA	Merck
Eisessig	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethanol	Merck
Formaldehyd 37%	Merck
Formamid	ICN
Glycerin	Merck
HCl	Merck
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Riedel de Haen
Isopropanol	Merck
Jodacetamid	Sigma
Kristallviolett	Serva
Lithiumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Maleinsäure	Merck
Mercaptoethanol	Merck
MOPS	ICN
NaCl	Riedel de Haen
NaOH	Merck
Natriumacetat	Merck
NBT	Boehringer Mannheim
n-Octylglucopyranosid	Sigma
ortho-Phosphorsäure	Merck
Phenol/Chloroform	Sigma

## Material und Methoden

---

PMSF	GIBCO BRL
Protein A	Sigma
SDS	Serva
Saccharose	Merck
TEMED	Sigma
Titrisol	Merck
Tri-Na-Citrat-Dihydrat	Sigma
Tris base	ICN
Tris HCl	ICN
TritonX-100	Serva
X-Phosphat	Boehringer Mannheim
Xylencyarol	Sigma
Xylol	Merck

### Restriktionsenzyme, Enzyme:

Eco RI	GIBCO BRL
Bam HI	GIBCO BRL
T3-,T7-Polymerase	Boehringer Mannheim
DNAse I	Boehringer Mannheim
Super Taq	Boehringer Mannheim

### Käuflich erworbene Kits:

ABC-Kit	Vector
5-Bromo-2'-deoxy-uridine	Boehringer Mannheim
Labeling and Detection Kit	
Chemilumineszenzsubstrat	Boehringer Mannheim
CytoTox96® Non-Radioactive	Promega

## Material und Methoden

---

Cytotoxicity assay

DIG-RNA-Labeling Kit

Boehringer Mannheim

IL-5-ELISA

R&D Systems

IL-6-ELISA

Biomar

IFN- $\gamma$ -ELISA

Biomar

RNeasy Midi-Kit

Qiagen

TNF- $\beta$ - ELISA

Biomar

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. B-Zell-Isolierung aus humanen Tonsillen**

Unmittelbar nach der Tonsillektomie wurden die Tonsillen grob mechanisch mit einer Schere zerkleinert und diese Stücke durch ein mit kaltem sterilem PBS befeuchtetes Gewebesieb gepresst. Die Zellen wurden bei 1200 rpm 10 /Minuten abzentrifugiert und in 20 ml RPMI<sup>suppl</sup> + 5% FCS resuspendiert. Dazu pipettierte man 20 ml mit Neuraminidase behandelte Hammelerythrozyten (vgl. 2.2.14.); die Suspension wurde leicht anzentrifugiert (400 rpm, 5 Minuten) und mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Um die T- von den B-Lymphozyten zu trennen, wurde ein Ficoll-Gradient eingesetzt: Die Suspension wurde auf 15 ml warmes Ficoll geschichtet und 20 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert. Die rosettierten T-Zellen befanden sich im Erythrozyten-Sediment, die B-Zellen bildeten eine weiße Wolke im Ficoll, wurden abgezogen und dreimal mit kaltem RPMI<sup>suppl</sup> gewaschen. Zuletzt resuspendierte man die Zellen in einem kleinen Volumen RPMI<sup>suppl</sup> und ermittelte die Zellzahl durch Zählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer.

### **2.2.2. Infektion der B-Lymphozyten mit Influenza A-Virus**

Die isolierten und gezählten CD19<sup>+</sup>-Zellen wurden bei 1200 rpm für 15 min ohne Bremse abzentrifugiert, in 3 ml RPMI<sup>suppl</sup> resuspendiert und gleichmäßig auf zwei 50 ml-Probenröhrchen (Greiner) verteilt. Die Infektion erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit 2 MOI (multiplicity of infection) der Viruspräparation. Die Kontrollzellen erhielten ein entsprechendes Volumen RPMI<sup>suppl</sup>. Während der einstündigen Virusadsorption inkubierten die Zellen bei 37°C auf einem Drehrad. Anschließend wurden die Röhrchen mit PBS aufgefüllt und abzentrifugiert (1200 rpm, 15 min). Das Sediment wurde ein weiteres Mal gewaschen, die Zellen nochmals gezählt und dem jeweiligen Versuch entsprechend, in Lochplatten ausgesät.

### **2.2.3. Stimulation der CD19<sup>+</sup>-Zellen**

Verwendet wurde ein pflanzliches Lektin, das Pokeweed-Mitogen (PWM) in einer Konzentration von 10 µg/ml, PHA 10 µg/ml, Con A 1 µg/ml, Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien in einer Konzentration von 30 ng/ml, Interleukin-4 (IL-4) 50 ng/ml und Poly-I:C als Interferon- $\alpha/\beta$ -Stimulus in einer Konzentration von 10 µg/ml. Von der HA/NA-Isolierung wurden meist 25 µl eingesetzt, die Proteinmenge war 0,0104 mg/ml.

### **2.2.4. Gewinnung der Zellüberstände und der RNA**

Zu den entsprechenden Zeiten wurden die Zellüberstände abgenommen, die Zellen abzentrifugiert und die Überstände portioniert bei -20°C bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

Sollte die RNA gewonnen werden, wurde das verbleibende Zellpellet in RNA-Lyse-Puffer der Firma Qiagen aufgenommen und die RNA mit Hilfe des käuflichen RNeasy Midi-Kits isoliert und bei -80°C gelagert.

### **2.2.5. Bestimmung der Vitalität**

#### **2.2.5.1. LDH-Bestimmung**

50 µl Zellkulturüberstand wurden in eine 96-Lochplatte pipettiert und mit 50 µl Substratmix (gebrauchsfertige Lösung aus dem CytoTox96<sup>®</sup> Nonradioactive Cytotoxicity Assay der Firma Promega) vermischt. Im Dunkeln wurde die Platte für 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert, 50 µl Stopplösung zugegeben und die Extinktion bei 490 nm gemessen.

### **2.2.5.2. MTT-Test**

In diesem Farbstest wird die Stoffwechselaktivität mitochondrialer Enzyme gemessen, die in der Lage sind, das gelbe Tetrazoliumbromid MTT in ein wasserunlösliches blaues Formazanderivat umzuwandeln.

100 µl einer Zellsuspension wurden in ein Loch einer 96-Lochplatte pipettiert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml PBS) zugegeben und die Platten für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend löste man die unlöslichen Formazankristalle mit 100 µl SDS-DMF (20 g SDS in 50% DMF) durch eine Übernachtinkubation. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 570 nm.

### **2.2.6. Durchflußzytometrie**

Die Zellausbeute und -reinheit der isolierten CD19-Zellen wurde mit Hilfe der FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) überprüft. Zellen können mit dieser Methode nach Oberflächen-Antigenen, Größe und Granulation erfaßt werden. Antigene auf der Oberfläche werden mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern detektiert. Die Emission jeder einzelnen Zelle wird analysiert, während die Zellen in einem dünnen Strahl an sensitiven Detektoren vorbeigeleitet werden. Zellgröße und Granulation werden anhand der Lichtstreuung einer vorderen und seitlichen (90°) Lichtquelle gemessen. Insgesamt können so drei Parameter beim Durchfluß der Einzelzellen registriert werden. Durch Markierung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen können zwei Antigene parallel erfaßt werden. Meist werden Fluorescein (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet. Die Daten werden entweder als Histogramm wiedergegeben, indem Zellzahl gegen Intensität der Fluoreszenz aufgetragen wird oder in Form einer zweidimensionalen Dot-Plot-Darstellung, in der jeder Punkt eine Zelle gemäß Fluoreszenz und Größe repräsentiert.

Verwendete Ak-Lösungen:

Monoklonale Ak:

Anti-CD4, Anti-CD8, Anti-CD19, Anti-CD56, Anti-CD126: von der Firma Becton Dickinson, eingesetzt 1:20.

Hybridomüberstände:

Anti-CD22 (Klon BL-B22), Anti-CD40 (Klon BL-B40), Anti-CD23 (Klon BL-B23/1), Anti-CD69 (Klon Acp26): zur Färbung wurden 20 µl je Probe eingesetzt. Diese Überstände wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Drößler, Fachbereich Biowissenschaften der Universität Leipzig.

Anti-CD83: zur Färbung wurden 20 µl je Probe eingesetzt. Dieser Überstand wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Armin Bender, Universität Erlangen.

Fluoreszenzfarbstoffmarkierte Ak:

Anti-Kaninchen-Ig, PE-markiert	Dianova
Anti-Kaninchen-Ig, FITC-markiert	DAKO
Anti-Maus-Ig, FITC-markiert	Pharmingen
Anti-Maus-Ig, PE-markiert	Dianova

eingesetzt 1:20

### **2.2.6.1. Färbung der Oberflächenantigene**

Die entsprechend markierten Ak wurden in Polystyren-Rundboden-Röhrchen (12 x 75 mm, Falcon) vorpipettiert (4°C). Für die Autofluoreszenz wurde ein Röhrchen mit PBS angesetzt. Anschließend wurden je  $3 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von mindestens 50 µl in die Röhrchen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis im Dunkeln wurden die Zellen zweimal

gewaschen. Dazu gab man 3 ml kaltes PBS in jedes Röhrchen, zentrifugierte dieses (1200 rpm/ 4°C/ 5 min) und dekantierte den Überstand. Fixiert wurden die Zellen mit 3%-iger Formaldehydlösung (50 µl/ Röhrchen) für 5 min. Nach Zugabe von 250 µl Trägerflüssigkeit (FACSFlow, Becton Dickinson) erfolgte die Auswertung in einem FACScan (Becton Dickinson). Für die Darstellung wurden jeweils 3000 Zellen registriert.

### **2.2.7. Methoden zum Nachweis von Influenza-Viren**

#### **2.2.7.1. PCR**

##### **2.2.7.1.1. RNA-Isolierung**

Die RNA wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits (RNeasy Midi-Kit, Qiagen) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

##### **2.2.7.1.2. Synthese des cDNA-Erststranges**

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann RNA in DNA umgeschrieben werden. Oligo-dT diente als Primer, ohne den dieses Enzym nicht in der Lage ist, mit der Transkription zu beginnen.

Durchführung:

Ca 1-5 µg RNA wurden auf 10 µl mit aqua dest. aufgefüllt und mit 1 µl Oligo-dT19-24 (Amersham, Braunschweig) für 10 min bei 70°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen zu lösen und die Oligo-dT-Segmente an die Poly-A-Schwänze der mRNA anzulagern. Die Probe kam danach sofort auf Eis. Es folgte die Zugabe von 4 µl Reaktions-Puffer (5x, Gibco), 2 µl 0.1M DTT (Gibco BRL), 1 µl 10 mM dNTP-Mix (Promega) und 1 µl SuperScript<sup>TM</sup> II (Gibco BRL).



Während einer einstündigen Inkubation bei 39°C erfolgte die Transkription. Das Enzym wurde anschließend denaturiert (10 min bei 94°C).

### **2.2.7.1.3. Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Dieses *in-vitro*-Verfahren wird zur selektiven Anreicherung spezifischer DNA-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuren verwendet. Man nutzt die Eigenschaften von DNA-Polymerasen, einen Einzelstrang zum Doppelstrang polymerisieren zu können, sofern ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als Startpunkt zur Verfügung steht. Man läßt die DNA, die eine zu amplifizierende Sequenz enthält, mit einem Überschuß von zwei flankierenden chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primern) reagieren. Dadurch erhält man nach Denaturierung der DNA und Hybridisierung der Primer einzelsträngige Moleküle, die nur im Bereich des gebundenen Primers doppelsträngig sind. Dieser doppelsträngige Bereich dient als Startpunkt für die DNA-Polymerase, mit deren Hilfe der fehlende Einzelstrang zum Doppelstrang synthetisiert wird. Bei Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Hybridisierung der Primer und Polymerisation kommt es nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdopplung und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenz. Für die Reaktion wird die hitzestabile Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* eingesetzt, die ein Temperaturoptimum von über 70°C besitzt und für kurze Zeit bei Temperaturen von bis zu 95°C stabil ist. So können die zu polymerisierenden DNA-Einzelstränge durch Hitzedenaturierung erzeugt werden, ohne daß das Enzym zerstört und nach jedem Reaktionsschritt erneut zugegeben werden muß.

### **2.2.7.1.4. Primerauswahl, -sequenzen, -herstellung und -aufbereitung**

-Primerauswahl: Die DNA-Basensequenzen der jeweiligen Gene erhielt man von der Computer-Datenbank der "European Molecular Biology Organization" (EMBO), Heidelberg, Deutschland.

-Die Primersequenzen sind im Folgenden dargestellt:

GAPDH	sense	5' C GTC TTC ACC ACC ATG GAG A3'
	antisense	5' GCT ATA CCA GGA AAT GAG CTT 3'

Länge des entstehenden DNA-Fragmentes: 300 bp

Nukleoprotein	sense	5' TGG CGT CCC AAG GCA CCA AAC G3'
	antisense	5' CAT CAG AGA GCA CAT CCT GGG 3'

Länge des entstehenden DNA-Fragmentes: 500 bp

IFN $\alpha_2$	sense	5' TGG CAC AGA TGA GGA GAA TCT 3'
	antisense	5' GAC TAG TGC CTT AAG AGC TGA A3'

Länge des entstehenden DNA-Fragmentes: 320 bp

-Herstellung: Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-BIOTECH GmbH, Ebersberg in einer Menge von 40 nMol synthetisiert. Die Primer wurden auf 0,33  $\mu\text{g/ml}$  (entspricht 50 pM) eingestellt und bei 4°C gelagert.

#### **2.2.7.1.5. Amplifizierungsreaktion**

Die Reaktion wurde in einem 500  $\mu\text{l}$ -Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

Zu 1  $\mu\text{l}$  der in der Erststrangsynthese gewonnenen cDNA wurden 5  $\mu\text{l}$  Super-Taq-Reaktionspuffer (10 fach konzentriert), 0,2  $\mu\text{l}$  Super-Taq (Boehringer Mannheim) und jeweils 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (je 10 mMol), sense- und antisense Primer (50 pMol) hinzugefügt und mit aqua dest. auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

Die Amplifizierung wurde in einem Thermocycler (OmniGene, MWG-BIOTECH, Ebersberg) durchgeführt.

Die PCR-Bedingungen zur Amplifikation der verschiedenen DNA-Sequenzen sind der nachfolgenden Übersicht zu entnehmen:

Gen	Denaturierung	Hybridisierung	Polymerisation	Zyklen
Nukleoprotein	2,5 min 94°C	1 min 67°C	1 min 72°C	1
	1 min 94°C	1 min 67°C	1 min 72°C	30
	1 min 94°C	1 min 67°C	5 min 72°C	1
GAPDH	2,5 min 94°C	1 min 65°C	1 min 72 °C	1
	1 min 94°C	1 min 65°C	1 min 72°C	20
	1 min 94°C	1 min 65°C	5 min 72°C	1
IFN $\alpha_2$	2,5 min 94°C	1 min	1 min 72°C	1
	1 min 94°C	1 min	1 min 72°C	35
	1 min 94°C	1 min	1 min 72°C	1

#### 2.2.7.1.6. Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die amplifizierten Fragmente wurden in einem 1,5%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (horizontal system for submerged Gel Electrophoresis, BRL USA). Als Elektrophoresepuffer wurde TAE-Puffer eingesetzt.

10  $\mu$ l des jeweiligen PCR-Produktes wurden mit 3  $\mu$ l DNA-Probenpuffer versetzt, gemischt, kurz zentrifugiert und für 20 min bei 60°C denaturiert. 2  $\mu$ l eines 100 bp-Markers (Pharmacia) wurden auf 10  $\mu$ l mit aqua dest aufgefüllt und wie die Proben behandelt. Anschließend wurden alle Proben in die

Geltaschen aufgetragen und bei 80 V für 2 h aufgetrennt (Keutz Konsort Power Supply).

Danach färbte man das Gel für 30 min in Ethidiumbromid, da dieser Fluoreszenzfarbstoff in der Lage ist, in dsDNA zu interkalieren. Nach kurzem Entfärben in aqua dest, zur Verringerung des unspezifischen Hintergrunds, konnten die gefärbten Banden auf einem UV-Schirm (Fröbel Labortechnik) sichtbar gemacht werden. Zur Dokumentation wurde das Gelbild im Computer gespeichert und fotografiert (Fröbel, Labortechnik ).

TAE-Puffer:	0,04 M Tris-Azetat 0,001 M EDTA 1,1 ml Eisessig ad 1000 ml aqua dest
Ethidiumbromid:	50 µl Ethidiumbromid ad 100 ml aqua dest
DNA-Probenpuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyarol gelöst in 30% Glycerin

### 2.2.7.2. Nachweis der Virusproteinsynthese

Neusynthetisierte Proteine kann man radioaktiv markieren, indem man Zellen für kurze Zeit mit einem Medium inkubiert, dem eine Aminosäure fehlt. Die anschließend in radioaktiv-markierter Form zugesetzte Aminosäure wird von Zellen sofort in Proteine eingebaut. Nach Isolierung der Virusproteine aus dem Zell-Lysat werden diese durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach einem Fluorographiebad, Trocknen des Geles und Entwicklung auf einem Röntgenfilm kann man die spezifischen Proteinbanden darstellen.

Arbeitsschritte:

#### A. Radioaktivmarkierung neusynthetisierter Proteine

### B. Zellyse und Immunpräzipitation viraler Proteine

### C. SDS-PAGE

### D. Fluorographie

### A. Radioaktivmarkierung

Je  $7 \times 10^6$  isolierte CD19-Zellen wurden in 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit Gasaustauschdeckel (Costar) in einem Volumen von 500-1000  $\mu$ l ausgesät. Zum Zeitpunkt 0 h wurde die Hälfte der Röhrchen mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach einer einstündigen Adsorptionszeit bei 37°C wurden in jedes Röhrchen noch 3 ml RPMI<sup>suppl</sup> ohne FCS hinzugefügt. 40 min vor dem gewünschten Markierungszeitraum (4-6 h, 8-10 h, 10-12 h, 16-18 h, 22-24 h) wurden die Zellen bei 1200 rpm für 10 min abzentrifugiert und erhielten 1 ml 37°C warmes Methionin-freies Medium (Biochrom). Nach weiteren 30 min wurde <sup>35</sup>S-Methionin (Amersham) mit einer Aktivität von 3  $\mu$ Ci/ml in einem Volumen von 30  $\mu$ l hinzupipettiert. Während einer zweistündigen Inkubation wurden alle neugebildeten Proteine radioaktiv markiert. Für die Ernte wurden die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4°C) und der radioaktive Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen, die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 300  $\mu$ l eiskaltem RIPA-Puffer pro Röhrchen. Sofortiges Einfrieren der Zellen in Trockeneis mit Aceton verhinderte eine enzymatische Verdauung. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -70°C gelagert. Als Kontrolle dienten adhärente Hühnerfibroblasten, die in Schalen zu je  $2 \times 10^6$  Zellen pro Schale ausgesät worden waren. Die Behandlung erfolgte parallel, jedoch wurde statt der Zentrifugationsschritte das Medium lediglich abgesaugt, die Zellen nach Zugabe des RIPA-Puffers mit einem Zellschaber lysiert und ebenfalls in ein 15 ml-Röhrchen überführt.

### B. Lysataufarbeitung: Proteinbestimmung und Immunpräzipitation

Die aufgetauten, lysierten Zellen wurden mit Ultraschall behandelt, um alle Proteine in Lösung zu bringen (Sonofier Cell Disruptor B15, Branson). Die Ansätze der Hühnerfibroblasten wurden zur Entfernung von Schaberresten für 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und die Überstände in Reaktionsgefäße überführt. Um einheitliche Proteinmengen der Ansätze einzusetzen, wurde die Aktivität eines bestimmten Volumens (10 µl mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit, Roth) des Proteinlysats in einem  $\beta$ -Counter (Beckman LS 1801) bestimmt und auf 7000 cpm eingestellt.

Gleiche Proteinmengen wurden jeweils in 1 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit RIPA-Puffer auf 500 µl aufgefüllt. Durch Zugabe von Kaninchenimmunserum gegen virale Proteine (15 µl pro Lysat) wurden die viralen Proteine während einer zweistündigen Inkubation bei 4°C auf einem Schüttler (IKA-Schüttler MTS 2, Janke & Kunke GmbH u. Co KG; Staufen) an die spezifischen Antikörper gebunden. Zugewetztes Staphylokokken-Protein A (30 µl/Probe; Sigma) konnte durch seine Eigenschaft an den F<sub>c</sub>-Teil von Immunglobulinen zu binden, die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe präzipitieren (1 h bei 4°C auf dem Schüttler).

Anschließend wurde das Präzipitat bei 12000 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415). Mit RIPA-Puffer wurde das Sediment sorgfältig resuspendiert, auf 400 µl aufgefüllt und erneut bei obigen Bedingungen zentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschvorganges wurde das Sediment in 10 µl aqua dest aufgenommen. Für die sich anschließende SDS-PAGE wurden je 10 µl Probenpuffer zu den Ansätzen hinzugegeben und die Proteine durch 5-minütiges Kochen im Wasserbad denaturiert. Das im Probenpuffer enthaltene Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken und SDS konnte durch Anlagerung das entfaltete Protein stabilisieren und seine Ladung neutralisieren. Parallel wurde 1 µl eines radioaktiv-markierten Molekulargewichtmarkers (MG von 14,3 bis 200 kDa; <sup>14</sup>C-methylierte Proteine, Amersham) mit je 11 µl Aqua dest. und Probenpuffer behandelt. Das beim Kochen gebildete Kondenswasser wurde durch kurzes Abzentrifugieren gesammelt.

### C. SDS-PAGE

Mit Hilfe des anionischen Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS), welches mit Proteinen stabförmige Komplexe in konstantem Massenverhältnis bildet, können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch die hohe negative Ladung des SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und eine Proportionalität zwischen Molekülgröße und ihrer Ladung erreicht. Die Proteine werden bei ihrer Wanderung durch ein gleichmaschiges Netz im elektrischen Feld getrennt. Das dreidimensionale Netz wird aus Polyacrylamid gebildet, ein Polymerisationsprodukt aus Acrylamid-Monomeren, die durch Bisacrylamid vernetzt werden. Ammoniumpersulfat (APS) dient durch Radikalbildung als Polymerisationsstarter. TEMED wirkt als Katalysator. Größere Proteine werden eher bei ihrer Wanderung behindert als kleinere und wandern entsprechend weniger weit in Richtung Anode. Mit höheren Konzentrationen an Acryl- und Bisacrylamid (13-40%) kann das Netz verdichtet werden und so für die Auftrennung kleinerer Proteine dienen. Weitmaschige Netze (6-10%) werden dagegen für größere Proteine benutzt. Bei der hier durchgeführten diskontinuierlichen SDS-PAGE wurden die Proteine in einem 4,5%igen Sammelgel auf einer Startlinie ankonzentriert und im folgenden Trenngel (12%) aufgetrennt (Methode nach Laemmli, U.K. Nature 227:680-685, 1970 ).

#### Durchführung:

Für die Herstellung der Gele wurden die Glasplatten mit Abstandhaltern in eine Minigel-Vorrichtung eingespannt. Zuerst wurde die 12%-ige Trenngellösung angesetzt und mit Hilfe einer Spritze zwischen die Glasplatten bis 2 cm unter den oberen Rand eingefüllt. Nach Überschichtung mit aqua dest. erfolgte über einen Zeitraum von 45 min die Polymerisation. Die Wasserschicht sorgte für eine glatte Begrenzung des Gels. Nach Absaugen des Wassers wurde das

4,5%ige Sammelgel bis unter den Rand der Glasplatten eingefüllt und der Taschenformer eingesteckt. Die Erhärtung erfolgte während weiterer 45 min. Anschließend wurde der Taschenkamm herausgenommen, die Taschen mit Laufpuffer gewaschen und das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Gelkammer (Keutz) eingehängt. Die Proben wurden dann mit Hilfe einer Pipette mit Gelloader-Spitzen in die Taschen gefüllt. Über einen Transformator (Power Supply Consort E443; Keutz) wurde für die ersten 15 min eine Spannung von 60 V angelegt, bis die Proben die Grenze zum Trenngel erreicht hatten. Für weitere 80 min erfolgte die Trennung bei 150 V, bis die Front des Bromphenolblaus am unteren Gelrand angelangt war. Die Stromstärke war mit 250 mA jeweils maximal. Anschließend wurde das Gel entnommen und fixiert: für 10 min in Fixierlösung I (30% Ethanol/ 10% Essigsäure) sowie für 10 min und länger in Fixierlösung II (10% Ethanol/ 5% Essigsäure).

### D. Fluorographie

Zur Verstärkung der relativ schwachen Beta-Strahlung von  $^{35}\text{S}$ -Methionin wird eine Substanz eingesetzt, die durch Anregungsenergie die Schwärzung eines Filmes intensiviert.

In einem Fluorographiebad (Enlightning<sup>TH</sup>, Nr. NEF-974, Du Pont) wurde das fixierte Gel für 45 min leicht schaukelnd inkubiert. Für den Trocknungsvorgang wurde das Gel auf Filterpapier aufgelegt (Schleicher und Schüll Nr. GB 003), mit Frischhaltefolie überdeckt und auf einem Geltrockner mit Vakuumanschluß für ca. 45 min belassen (Geltrockner GT 1; Keutz/ Vakuumpumpe Lyovac GT 2; Leybold-Heraeus GmbH). In einer Filmkassette wurde das Gel auf einen Röntgenfilm (SB, Nr. 1648245; Kodak) aufgelegt und ungefähr für zwei Wochen bei -70°C exponiert. Nach dem Auftauen und Erwärmen der Filmkassette erfolgte die Entwicklung von Hand in Entwickler (G 153; Agfa-Gefaert) und Fixierer (G 354; Agfa-Gefaert).

Reagenzien:

RIPA-Puffer: 1% TritonX-100



## Material und Methoden

---

1% Desoxychlorsäure

0,1% SDS

Aprotinin (0.25 ml Trasylol® mit 50 KIE auf 100 ml Puffer)

0,15 mol/l NaCl

0,02 mol/l Trispuffer (pH 7-8)

0,01 mol/l EDTA

0,001 mol/l Phenylmethylsulfonylfluorid

0,01 mol/l Jodacetamid

KIE: Kallikrein-Inhibitor-Einheiten

Farbreagenz: Aus 75 mg Coomassieblau (Serva Blau G, Heidelberg), 55 ml ortho-Phosphorsäure (85%, Merck), 20 ml Ethanol (95%) ad 300 ml aqua dest. wurde eine 0,075%ige Färbelösung hergestellt.

Probenpuffer: 2-fach konzentrierter Probenpuffer wurde aus 20% Glycerin, 10% Mercaptoethanol, 6% SDS, Tris-Puffer (pH 6,8) 0,37 mol/l, 2,5% Bromphenolblau ad 50 ml aqua dest. hergestellt.

Trenngel 12%: 12% Acrylamid (Roth, Karlsruhe)  
0,32% Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)  
0,1% SDS  
Tris-HCl (pH 8,8) 0,375 mol/l  
0,05% APS  
0,1% TEMED

Sammelgel 4,5%: 4,5% Acrylamid  
0,12% Bisacrylamid  
0,01% SDS  
Tris-HCl (pH 6,8) 0,125 mol/l  
0,05% APS

0,1% TEMED

### **2.2.7.3. Plaquetest**

Im Plaquetest kann die Anzahl infektiöser Viruspartikel bestimmt werden. Dazu wird virushaltige Probe auf permissive Zellen gegeben, wobei die Diffusion neugebildeter Viren durch Überschichtung mit agarosehaltigem Medium eingeschränkt wird. So formieren sich lokal definierte Regionen im Zellrasen, die durch Zell-Lyse aufgrund der Virusinfektion entstehen. Durch Anfärbung werden diese Plaques sichtbar gemacht (Wagner, R.R.1961).

Als Testzelllinie wurden MDCK II-Zellen verwendet, die für den Test in 6-Loch-Platten (Falcon) ausgesät wurden ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Loch in 3 ml RPMI<sup>suppl</sup> mit 5% FCS). Nach einer Inkubationszeit von 24 h im Brutschrank, während der die Zellen einen Monolayer bildeten, wurden die Proben in meist zwei bis drei Verdünnungsstufen in einem Volumen von 333 µl auf die gewaschenen Zellen aufgetragen.

Während der folgenden einstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Platten mehrmals bewegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Probe zu gewährleisten. Das vorbereitete, auf 41°C erwärmte, 0,5%ige Agarose-Medium wurde anschließend zu je 3 ml pro Loch auf die Probe pipettiert. Das Medium erhärtete innerhalb von wenigen Minuten. Die Kulturplatten inkubierten für 3 Tage in einer feuchten Kammer im Brutschrank. Im Anschluß wurden die Zellen für 4-6 Stunden mit 0,5 ml/Loch formalinhaltiger Kristallviolett-Lösung fixiert und gefärbt. Nach Entfernen der Agarose, Spülen der Platten unter fließendem Wasser mit anschließendem Trocknen konnten die Plaques ausgezählt werden. Die infektiösen Viruspartikel wurden als PFU/ml angegeben (Plaquetforming Units), die durch Multiplikation der Plaquezahl mit dem Faktor 3 (Probenvolumen 333 µl) und der Verdünnungsstufe errechnet wurden.

Voraussetzung für die Infektiosität von Influenza A-Viren ist die Spaltung des HA-Moleküls. Ob das Virus bereits mit proteolytisch gespaltenem HA aus der

Wirtszelle kommt, hängt dabei sowohl von der Wirtszelle als auch dem darauf angewendeten Virusstamm ab (Klenk, H-D. *et al.* 1975). So kann es nötig sein, virushaltige Zellkulturüberstände mit Trypsin zur HA-Spaltung nachzubehandeln, bevor ein Plaquetest durchgeführt wird: Unmittelbar vor der Testung wurden die Proben mit Trypsin (100 µg Trypsin/ml Probe) für 15 min bei 37°C inkubiert.

Reagenzien und Medium:

2,5% Trypsin (Seromed) wurde 1:10 vorverdünnt, davon wurden 4 µl auf 100 µl Probe eingesetzt.

0,5% Agarose-Medium:

Für 100 ml Medium wurden 0,5 g Agarose Typ L (Behringwerke AG, Marburg) in 50 ml aqua dest. aufgekocht. Parallel wurde zweifach konzentriertes RPMI<sup>suppl</sup> angesetzt:

10 ml RPMI 1640 ( 10 x)

je 0,5 ml Glutamin, Pyruvat, HEPES, Penicillin/Streptomycin

5,5 ml Bicarbonat (Biochrom 7,5% )

ad 50 ml aqua dest.

Beide Lösungen wurden im Wasserbad auf 41°C erwärmt und kurz vor Gebrauch gemischt.

KV-Stammlösung:

2% (w/v) Kristallviolett (Serva) in

0,2 Vol EtOH (96%)

0,1 Vol Formalin (37%)

0.7 Vol aqua dest.

Farbelösung:

0,1 Vol Stammlösung

0,1 Vol Formalin (37%)

0,8 Vol aqua dest.

### **2.2.8. Vermehrung und Reinigung von Influenza A-Viren**

Befruchtete Hühnereier mit 11 Tage alten Embryonen dienen als Vermehrungssystem für Influenza A-Viren, wobei Titer von  $10^8$ - $10^{10}$  PFU/ml erzielt werden (Barrett, T. 1985). Das Virusinokulum wird in die Allantoishöhle injiziert und infiziert von dort aus die Chorioallantois-Membran. Vermehrte Viruspartikel werden in die Allantoisflüssigkeit abgegeben, die 2 Tage nach Infektion geerntet wird. Das Virus wird über Zentrifugationsschritte gereinigt, in PBS verdünnt und in Aliquots in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

#### Vorbereitung der Eier und Beimpfung

Befruchtete Hühnereier wurden 11 Tage bei 37°C in einem Brutschrank (40-60% Luftfeuchte) inkubiert und alle 6 h automatisch gewendet. Mittels einer UV-Schierlampe kontrollierte man, ob die Embryonen vital waren (Herzbewegung) und eine funktionierende Gefäßversorgung besaßen. Durch Anzeichnen der Luftkammergrenze und einer angrenzenden, gefäßarmen Region wurde die Injektionsstelle markiert. Mit Jodlösung (0,05 mol  $J_2$ /l, Titrisol, Merck) wurde die Kalkschale um die Beimpfungsstelle desinfiziert, wenige Millimeter oberhalb der Markierung angebohrt und 0.2 ml Virusinokulum mit einer Spritze vertikal eingespritzt. Als Inokulum diente unbehandelte, virushaltige Allantoisflüssigkeit, die 1:1000 in HBSS (Hanks' balanced salt solution, Gibco) verdünnt wurde. Das Bohrloch wurde zum Schutz vor Infektionen mit Holzleim verschlossen und die Eier bei 37°C und 80% Luftfeuchte für 2 Tage inkubiert. In dieser Zeit vermehrten sich die Viren. Abgestorbene Embryonen wurden mit Hilfe der Schierlampe aussortiert.

#### Ernte der Allantoisflüssigkeit

Abkühlung der Eier über Nacht (4-18 h) bei 4°C bewirkte eine Gefäßkonstriktion und führte somit zum Absterben der Embryonen. Am stumpfen Eipol oberhalb der Luftkammer wurde die Allantoisflüssigkeit mit einer Kanüle (10 ml-Spritze) abgesaugt. Es mußte darauf geachtet werden, daß die geerntete Flüssigkeit sofort eisgekühlt wurde und keine Erythrozyten oder sonstige Partikel (Trübung) enthielt. Bei einem Ansatz von 250 Eiern konnte man ca. 2-3 l Allantoisflüssigkeit gewinnen (7-12 ml pro Ei).

### Reinigung der Influenza A-Viren

Die erste Zentrifugation erfolgte für 30 min bei 6000 rpm ohne Bremse (Rotor JA-10 mit max. 6 x 500 ml, Zentrifuge J21; Beckman Instruments GmbH München 80) und wie alle folgenden Schritte bei 4°C. Das Sediment mit Zellen und Zelltrümmern wurde verworfen, der Überstand in einem zweiten Schritt mit höherer Geschwindigkeit (55 min bei 18000 rpm, ohne Bremse, Rotor JA-19 mit max. 6 x 250 ml, Zentrifuge L7-55; Beckman) zentrifugiert, wobei das Virus pelletierte. Man überschichtete das Virussediment mit 500 µl PBS je Zentrifugenbecher und ließ das Virus für 1 h quellen. Anschließend folgte eine intensive Resuspendierung des Sediments, wobei zunächst eine feine, dann eine 1 ml-Tuberkulinspritze Verwendung fand. Ein am vorherigen Tag angefertigter Saccharosegradient war aus autoklavierten Saccharose-Stammlösungen (Saccharose, Merck; verdünnt in PBS) hergestellt worden. Dabei waren je 6.1 ml Saccharoselösung (30 bis 55% in 5%-Schritten, w/v) in ein steriles Ultra-Clear™ Röhrchen (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 90 min im Dunkeln) so übereinander geschichtet worden, daß die Dichte im Röhrchen von oben nach unten zunahm (Röhrchen für Rotor SW 28, Beckman). Der geschichtete Gradient wurde durch Lagerung bei 4°C in einen kontinuierlichen überführt, indem sich die Konzentrationen an den Grenzschichten angeglichen. 1-5 ml der ankonzentrierten Virussuspension wurden auf einen Gradienten überführt. Bei hoher Geschwindigkeit wurden die Röhrchen über Nacht zentrifugiert (16 h bei 24000 rpm /4°C /ohne Bremse; Rotor SW 28, Zentrifuge L7-55, Beckman). Das Virus befand sich danach in einer weißlich-trübe Zone im unteren Viertel des

Gradienten (bei ca. 45% Saccharose), aber es zeigten sich auch weniger deutliche Bereiche mit entsprechend geringerem Virustiter. Die Bande wurde großzügig abgenommen und mit kaltem PBS vermischt. Nach der anschließenden Zentrifugation (45-60 min bei 24000 rpm/ 4°C /ohne Bremse, Rotor SW 28, Zentrifuge L7-55; Beckman) befand sich das Virus wiederum im Pellet. Es folgte ein Quellvorgang und Resuspendierung wie oben beschrieben. Virusaggregate konnten durch 5-minütige Zentrifugation bei 3000 rpm entfernt werden. Die Lagerung erfolgte in kleinen Portionen in flüssigem Stickstoff.

### **2.2.8.1. Isolierung der Influenza-Glykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase**

Gereinigtes Influenza Virus wurde nach Quellung in PBS-Puffer (16 h bei 4°C) für 3 min auf Stufe 9 ultraschallbehandelt (Transonic Digital, Elma), um Virusaggregate aufzulösen. 500 µl Virussuspension wurde in Anwesenheit von 10% n-Octylglucopyranosid (Sigma, Deisenhofen) 15 min bei Zimmertemperatur inkubiert, nochmals ultraschallbehandelt und 10 min bei 12000xg abzentrifugiert. Dabei wurden ungelöste virale Strukturproteine wie das Nukleoprotein und das Matrixprotein entfernt. Nach weiteren 2 h Inkubation bei 4°C wurden die letzten nicht gelösten Bestandteile durch 30-minütige Zentrifugation bei 100000xg entfernt. Zur Isolierung der Membranproteine HA und NA wurde der Überstand auf einen 5-30%-gen (w/w) Saccharosegradienten mit 60%-igem Saccharosekissen aufgetragen, der 1% n-Octylglucopyranosid enthielt. Nach 17-stündiger Zentrifugation bei 200000xg in einem SW 41-Rotor (Beckman) wurden 1 ml-Fractionen durch Austropfen des Gradienten gewonnen. Zur Bestimmung der Fractionen, die das HA/NA enthielten, wurden 10µl jeder Fraction im SDS-PAGE (Vgl 2.2.7.2. C) aufgetrennt und das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt

### **2.2.8.2. Coomassie Brilliant Blue-Färbung**

Durch die Coomassie-Färbung können Proteine im Polyacrylamid-Gel sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Gel für mindestens 30 min bei Raumtemperatur in der Coomassie-Färbelösung fixiert und gefärbt. Der überschüssige Farbstoff im Gel wurde nachfolgend durch Entfärbung herausgelöst und das Gel zwischen einer Plastikfolie getrocknet.

### **2.2.9. Nachweis von Zytokinen**

IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  wurden mit käuflich erworbenen Kits der Firma Biomar nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

### **2.2.10. Nachweis von Chemokinen**

IL-8, MCP-1 und MIP-1 $\alpha$  und - $\beta$  wurden mittels ELISA-Technik nachgewiesen. Die ELISAs wurden in unseren Labors etabliert.

Prinzip der ELISAs:

Beschichten der Platte mit dem ersten Ak, verdünnt in Beschichtungspuffer. Nach einer Übernacht-Inkubation bei 4°C folgte ein Block-Schritt mit Block-Puffer für 1 h bei ZT. Nach dreimaligem Waschen wurden die Proben aufgetragen und für 2 h bei ZT inkubiert. Nach weiteren Waschschritten folgte die Zugabe des markierten Zweit-Antikörpers, dem das Substrat folgte.

Verwendete Puffer-Lösungen:

Beschichtungs-Puffer:

PBS ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>

Block-Puffer:

PBS + 0,05% Tween + 2% BSA

Wasch-Puffer:

PBS + 0,05% Tween

Verwendete Ak-Paare der Firma Pharmingen wurden in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt.

## **2.2.11. Nachweis von IFN- $\alpha$ und - $\beta$**

### **2.2.11.1. Herstellung einer DIG-markierten Sonde**

Die cDNA für ein 790 bp Genomstück von IFN- $\alpha_2$  lag schon in einen Bluescript II KS +/- -Vektor einkloniert vor (Geschenk von Dr. Rainer Zawatzky). Um daraus eine DIG-markierte RNA-Sonde herzustellen, wurde das Plasmid linearisiert und anschließend mit Hilfe des DIG-RNA-Labeling Kits der Firma Boehringer Mannheim, die cDNA in RNA umgeschrieben.

#### **2.2.11.1.1. Plasmidlinearisierung**

2  $\mu$ g des Plasmides wurden mit jeweils 8  $\mu$ l Restriktionsenzym Eco RI und Bam HI und 10  $\mu$ l Puffer (React 3) mit H<sub>2</sub>O auf 100  $\mu$ l aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt: Zum Verdau wurden 400  $\mu$ l aqua dest. und 500  $\mu$ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben, die Suspension gut gemischt und zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und erneut mit Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Durch Zugabe von 3 M Natriumacetat pH 5,2 und Isopropanol wurde die DNA gefällt und bei 14000 rpm für 30 min zentrifugiert (Heraeus, Hanau). Das Sediment wurde gewaschen, luftgetrocknet und in 10  $\mu$ l aqua dest. aufgenommen.



#### **2.2.11.1.2. DIG-RNA-Markierung**

Für die Umschreibung der mit Eco RI geschnittenen Plasmide wurde die T3-Polymerase, für die mit Bam HI geschnittenen die T7-Polymerase verwendet, um die DNA-Matrize abzuschreiben.

10 µl des verdauten Plasmides wurden zusammen mit 2 µl Polymerase, 2 µl 10x-Puffer, 2 µl Nukleotidmix, 1 µl RNase-Inhibitor und 3 µl aqua dest. für 2 h bei 37°C inkubiert, danach erfolgte die Zugabe von 2 µl DNase I, um die DNA-Matrize zu zerstören (15 min, 37°C). Gestoppt wurde diese Reaktion mit 2 µl 0,2 Mol/l EDTA pH 8. Die entstandene RNA wurde mit 4 M LiCl und 100% Ethanol gefällt, abzentrifugiert (14000 rpm, 30 min), getrocknet und in 50 µl aqua dest. aufgenommen.

#### **2.2.11.1.3. Überprüfung der Sonde**

Um die Sondenmenge und die Effizienz der Markierung zu überprüfen, wurde die RNA-Sonde mit Hilfe eines Formaldehydgels angefärbt und auf eine Membran geblottet, anschließend wurde eine Farbreaktion zum Nachweis der eingebauten DIG-markierten Nukleotide durchgeführt.

Durchführung:

Die Gelkammer und die Kämme wurden 1 h mit 3%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sterilisiert und dreimal mit aqua dest gespült. Es wurde ein 1%-iges Agarosegel in MOPS-Puffer gegossen: die Agarose wurde nach dem Aufkochen im Wasserbad auf 60°C abgekühlt und mit 5% (v/v) Formaldehyd versetzt. Als Laufpuffer verwendete man wiederum MOPS-Puffer.

Probenvorbereitung:

2 µg RNA und 2,5 µl Proben-Cocktail wurden mit aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt. Nach einer 10-minütigen Denaturierung bei 60°C wurde das Gel mit den Proben beladen und für 1 h bei 100 V gefahren.

Färbung des Gels:

Das Gel wurde für 30 min in 100 µl Ethidiumbromid/1 Liter H<sub>2</sub>O gefärbt und anschließend für 1h in 0,1 M Ammoniumacetat entfärbt.

Aufbau des Blots:

Das Gel wurde 3x 20 min gewässert, um das Formaldehyd auszuwaschen, danach in 10x SSC equilibriert.

Unter das Gel platzierte man 3 auf Gelgröße zugeschnittene Whatmanpapiere, darauf eine Brücke, die ins Pufferreservoir reicht, über das Gel die Membran und 3 weitere Whatmanpapiere, auf die dann ein Stapel Tücher gelegt wurden. Dieser Aufbau wurde mit einem Gewicht beschwert und über Nacht bei 4°C geblottet, wobei als Blottingpuffer 20x SSC verwendet wurde.

Nach dem Abbau wurde die Membran beschriftet, die RNA durch UV-Bestrahlung an die Membran vernetzt (1,24 J/cm<sup>2</sup>) und diese bei 4°C bis zur Hybridisierung gelagert.

Benötigte Lösungen:

### **Probencocktail:**

750 µl Formamid  
150 µl 10x MOPS-Puffer  
240 µl Formaldehyd 37%  
100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O  
100 µl Glycerin  
80 µl 1%-iges Bromphenolblau  
abportioniert bei -20°C lagern

### **20x SSC-Puffer**

350,6 g NaCl  
176,4 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat  
in 1 Liter aqua dest. lösen  
mit 1N NaOH auf pH 7  
einstellen, auf 2 Liter  
auffüllen

### **10x MOPS-Puffer**

41,8 g 4-Morpholinopropansulfonsäure

4,1 g Natriumacetat

20 ml 0,5 M EDTA

mit 2 N NaOH auf pH 7 einstellen, auf 1 Liter mit aqua dest. auffüllen

**Membran:**

Boehringer Mannheim positively charged Nylon membrane (30 cm x 3 m, Nr.1417240)

**2.2.11.1.4. Farbreaktion mit NBT und X-Phosphat**

Die Effektivität des Einbaus DIG-markierter Nukleotide wurde über eine Farbreaktion unter Zuhilfenahme von Anti-DIG-Antikörpern, die mit alkalischer Phosphatase markiert sind, überprüft. Als Enzymsubstrat diente NBT und X-Phosphat.

**Durchführung:**

Die Membran wurde 5 min in Maleinsäurepuffer equilibriert, anschließend bei ZT für 30 min in 2% Blockpuffer inkubiert. Nach der Inkubation mit der Anti-DIG-Antikörper-Verdünnung (150 U/200 µl, 30 min ZT) wurde die Membran 3x für 10 min mit Maleinsäurepuffer gewaschen. In Reaktionspuffer wurde die Membran erneut equilibriert, bevor die Inkubation mit dem Substrat ( 2 ml Reaktionspuffer + 9,0 µl NBT + 7,0 µl X-Phosphat) im Dunkeln erfolgte (solange, bis Banden sichtbar wurden). Die Membran wurde 10 min gewässert, 10 min in TE-Puffer inkubiert und getrocknet.

Die RNA-Sonde wurde in 50% Formamid bei -80°C gelagert.

**Benötigte Lösungen:**

**10x Blockpuffer**

50 g Blocking-Reagenz

500 ml Maleinsäurepuffer

aufkochen und portioniert bei -20°C lagern

#### **2.2.11.1.5. Northern Blot-Analyse**

Die mit aqua dest. und 2x SSC-Puffer angefeuchtete Membran wurde mit 10 ml Prähybridisierungsmix und 100 µl Salm-DNA für 2 h bei 68°C inkubiert, bevor die Sonde dazu pipettiert wurde. Zur Hybridisierung wurden 10 µl RNA-Sonde mit 10 ml Hybridisierungsmix versetzt und über Nacht weiter inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit Waschlösung I und 2 Waschschrte mit Waschlösung II. Danach wurde die Membran 5 min bei ZT in Maleinsäurepuffer equilibriert, für 30 min in 2% Blockpuffer abgesättigt und mit Anti-DIG-Antikörper, markiert mit alkalischer Phosphatase (150 U/200µl in Blockpuffer), für 30 min bei ZT inkubiert. Die Membran wurde 3x für 10 min mit Maleinsäurepuffer + 0,3% Tween gewaschen, anschließend 5 min in Reaktionspuffer erneut equilibriert. Für die Chemilumineszenzreaktion wurde gebrauchsfertiges CDP Star als Substrat verwendet. Die Membran wurde dazu 15 min im Dunkeln bei 37°C inkubiert, um die Reaktion zu starten. Zur Sichtbarmachung dieser Reaktion wurde ein Film aufgelegt.

Benötigte Lösungen:

##### **10x Maleinsäurepuffer**

232,1 g Maleinsäure  
175,3 g NaCl  
160,6 g NaOH  
pH 7 einstellen, auf 2 Liter  
mit aqua dest auffüllen

##### **Reaktionspuffer**

5,84 g NaCl  
0,83 g Tris HCl  
11,58 g Tris base  
auf 1 Liter mit aqua dest.  
auffüllen, kurz vor Gebrauch  
0,2% MgCl<sub>2</sub> zusetzen

### **2.2.11.2. Nachweis von IFN- $\alpha$ und - $\beta$ im Bioassay**

Der Gehalt an Interferon  $\alpha/\beta$  (IFN- $\alpha/\beta$ )-Aktivität in Überständen von CD19-Zellen wurde bestimmt über die Hemmung des zytopathischen Effekts von Vesikulärem Stomatitisvirus (VSV) auf HeLa-Zellen und MDBK-Zellen.

Durchführung:

Die Testzellen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten (Nunc) ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. In serumfreiem RPMI<sub>sup</sub>-Medium verdünnte Proben wurden in einem Volumen von 100  $\mu$ l/Loch eingesetzt. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37°C wurden die Überstände abgezogen und ersetzt durch 100  $\mu$ l/Loch VSV-haltiges Medium (1:30). Nach einer weiteren 12-18 stündigen Inkubation bei 37°C wurden 10  $\mu$ l MTT-Reagenz (Endkonzentration 0,75 mg/ml; Sigma Nr. 2128) pro Loch zupipettiert und nochmals für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 100  $\mu$ l 0.04 m HCl in Isopropanol lysiert. Anschließend wurden die Platten photometrisch bei 570 nm, gegen 630 nm Referenzwellenlänge, gemessen (Plattenphotometer MR 7000; Dynatech). Die Extinktion korreliert dabei mit der Zahl und der metabolischen Aktivität der Zellen.

Der Gehalt an IFN- $\alpha/\beta$ , angegeben in U/ml, berechnet sich durch Vergleich mit einer Eichreihe unter Verwendung eines rekombinanten Standards in Verdünnungen von 0.01 bis 100 U/ml. Hierzu wurde humanes IFN- $\alpha$ 2C ( $3 \times 10^8$  U/mg), freundlicherweise überlassen vom Ernst-Boehringer-Institut für Arzneimittelforschung in Wien, eingesetzt.

Die Berechnung der spezifischen Farbaufnahme der durch IFN geschützten Kulturen erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Spezifische Farbaufnahme (in \%)} = \frac{\text{O.D. Probe} - \text{O.D. VSV - Kontrolle}}{\text{O.D. Zellkontrolle} - \text{O.D. VSV - Ko.}} \times 100$$

O.D.: Extinktion bei 570 nm gegen 630 nm Referenz

### 2.2.12. Nachweis der Zell-Proliferation

Verwendet wurde der 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) Labeling and Detection Kit III der Firma Boehringer Mannheim, eine nichtradioaktive Alternative zum [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Test:

Der Einbau von BrdU anstelle von Thymidin wird als Parameter für DNA-Synthese und Zell-Proliferation gewertet, indem ein monoklonaler POD-markierter Antikörper gegen BrdU in einer ELISA-Technik eingesetzt wird. Der Umsatz des Substrates Luminol wurde in einem Luminometer der Firma EG&G Berthold gemessen und ist proportional zur Einbaurrate des BrdU.

Es wurden  $0,2 \times 10^6$  Zellen in 100 µl RPMI<sup>suppl</sup> + 10% FCS in spezielle 96 Mikrovertiefungsplatten der Firma Costar pipettiert, mit den entsprechenden Stimuli versetzt und über einen Zeitraum von 1 bis 4 Tagen bei 37°C inkubiert. 16 h vor Inkubationsende wurde je Vertiefung 10 µl BrdU 10 µmol/l zupipettiert. Nach Inkubationsende wurden die Platten im Plattenrotor bei 1500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand mit einer Kanüle vorsichtig abgezogen und die Zellen für 2 Stunden bei 60°C getrocknet. Anschließend wurden sie mit einem Ethanol/HCl-Gemisch für 30 Minuten bei -20°C fixiert und mit Waschmedium, das 10% FCS enthielt gewaschen. Nach 30-minütiger Inkubation mit 100 µl Nuclease je Vertiefung, die die zelluläre DNA verdauen soll, erfolgte wieder ein Waschschriff, bevor 100 µl POD-markierter Antikörper (0,025 U) gegen BrdU in jede Vertiefung pipettiert wurden. Während der halbstündigen Inkubationszeit wurde das Chemilumineszenz-Substrat, bestehend aus Luminol, 4-Iodophenal und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach Vorschrift angesetzt. Substratzugabe, Messung und Auswertung des Testes erfolgte mittels des Luminometers.

### **2.2.13. Immunhistochemische Färbung**

Hergestellt wurden die Zytospin-Präparate, indem ca.  $0,1 \times 10^6$  Zellen in RPMI<sup>suppl</sup> + 10% FCS auf Objektträger aufzentrifugiert wurden. Die Zellen wurden für 10 Minuten in kaltem Isopropanol bei 4°C fixiert. Um die endogene Peroxidase in den Zellen zu inaktivieren, wurden die Objektträger für 2 Minuten in aqua dest., anschließend für 10 Minuten in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Dunkeln, dann erneut für 2 Minuten in aqua dest. inkubiert. Die nachfolgend benötigten Lösungen sind im ABC-Kit der Firma Vektor enthalten. Nach einem Waschschrift in PBS inkubierte man für eine Stunde den ersten Antikörper, der in PBS/BSA/Avidin verdünnt worden war. Erneut wurde mit PBS gewaschen. Der biotinierte Antikörper wurde 1:400 in PBS/Pferdeserum/Biotin verdünnt und für 30 Minuten inkubiert. Ein letzter Waschschrift mit PBS ging der 30-minütigen Inkubation mit dem Avidin/Biotin-Komplex voran, bevor die Objektträger kurz mit TBS gespült und mit dem DAB-Substrat (0,5 mg/ml TBS) für 15 Minuten inkubiert wurden. Die Farbreaktion wurde mit aqua dest. gestoppt, eine Dehydratisierung mit 96% Ethanol, 100% Isopropanol und Xylol angeschlossen und die Zellen mit Corbidbalsam eingedeckt.

Die verwendeten Ak wurden von der Firma Dako bezogen und laut Vorschrift eingesetzt.

### **2.2.14. Neuraminidase-Behandlung von Hammelerythrozyten**

Die Erythrozyten wurden zweimal mit RPMI-Medium gewaschen, dann als 10%-ige Lösung eingestellt und für 1 h bei 37°C mit Neuraminidase (Test-Neuraminidase, Behring-Werke, 100 µl/20ml Erythrozyten-Suspension) inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit RPMI-Medium gewaschen, die Erythrozyten wurden in 20 ml resuspendiert und bei 4°C gelagert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Zellverteilung in Tonsillen

Um zu ermitteln, wieviele CD19-positive B-Lymphozyten aus einer Tonsille zu isolieren sind, wurde vor der Aufarbeitung der Anteil der einzelnen Leukozyten anhand der Anfärbung spezifischer Oberflächenantigene mittels FACS bestimmt. Die erhaltene Anzahl der B-Lymphozyten schwankte von Spender zu Spender, weshalb hier auch die Ergebnisse zweier Spender dargestellt wurden. Da es sich um Operationsmaterial handelte, von dem hier nur ein Teil weiterverarbeitet werden konnte, variierte die Ausgangs- bzw. Endzellzahl sehr stark, abhängig von der Gesamtgröße der Tonsille und davon, wieviel Gewebe zur histologischen Untersuchung verwendet wurde.

Erfahrungsgemäß teilten sich die B- und T-Lymphozyten den größten Anteil, wobei die CD4-Helfer-Zellen stärker als die zytotoxischen CD8-Zellen vertreten waren. Monozyten/Makrophagen waren so gut wie nicht nachzuweisen, ebenso CD56-positive NK- wie CD83-positive dendritische Zellen.

Der Anteil der B-Zellen bei Spender 1 betrug 76,7% (2% der Zellen sind unspezifisch angefärbt, vgl. Bild A und werden in B-D abgezogen), zu sehen in Abb 1 Bild B. 18,6% der Zellen waren CD4-Zellen (Bild C), 3,2% CD8-positive Zellen (Bild D). CD14- und CD56-positive Zellen kamen praktisch nicht vor (Bild E und F).

Bei Spender 2 waren 2,2% der Zellen unspezifisch gefärbt (Bild A) und dieser Wert wird von Bild B-D abgezogen. Die Verteilung war folgendermaßen: Bei 44,9% der Zellen handelte es sich um CD19 gefärbte Zellen (Abb 2 Bild B), 44,5% der Zellen waren CD4-positiv (Bild C), 8,6% waren CD8-positiv (Bild D), CD14- und CD56-positive Zellen kamen auch bei diesem Spender nicht vor (Bild E und F).



## Ergebnisse

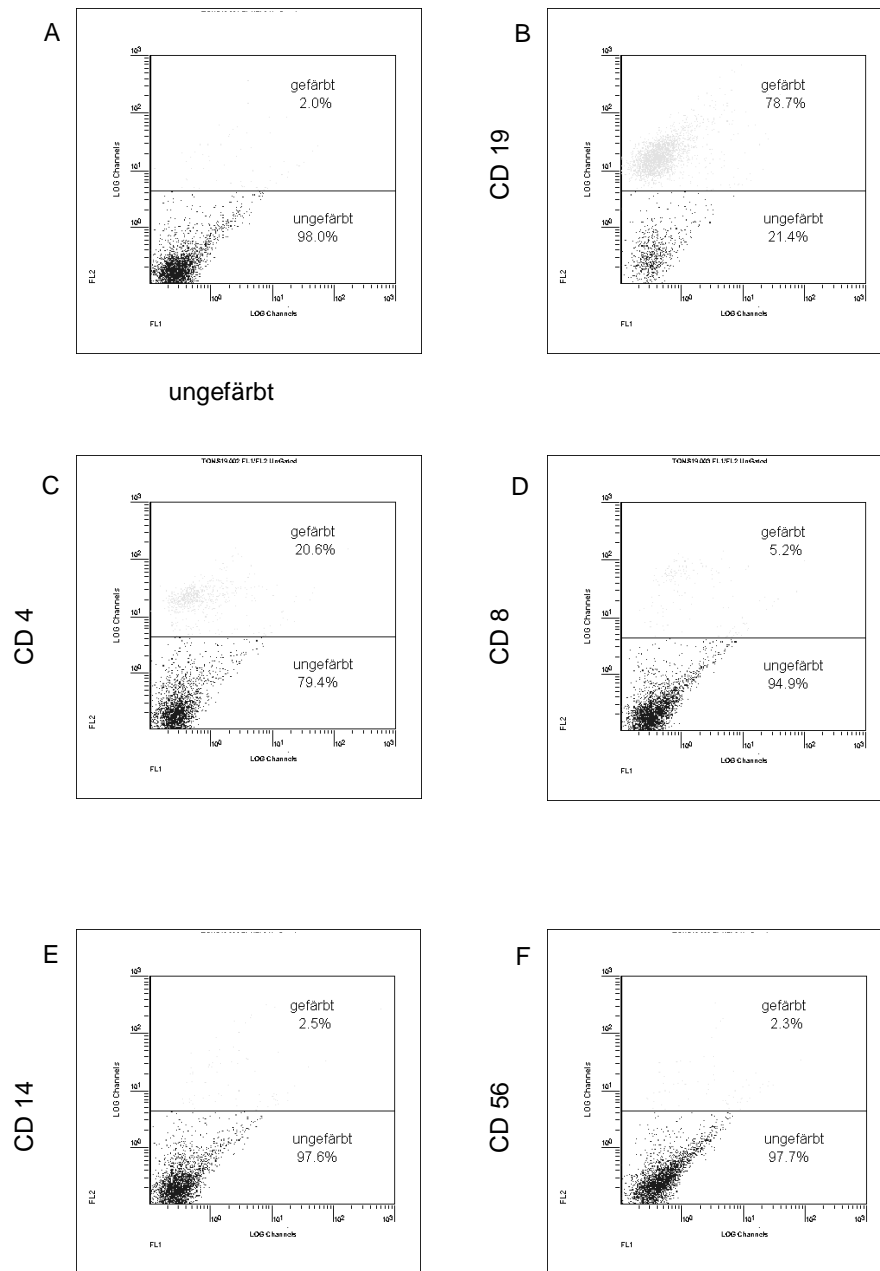


Abb 1: Darstellung der Zellverteilung in Tonsillen vor der B-Zell-Isolierung durch Färbung spezifischer Oberflächen-Antigene mittels FACS-Technik.

A: Ungefärbte Zellen B: CD19 positive B-Lymphozyten C: CD4-positive T-Zellen D: CD8 T-Zellen E: CD14-gefärbte Monozyten/Makrophagen F: CD56 positive NK-Zellen.

## Ergebnisse

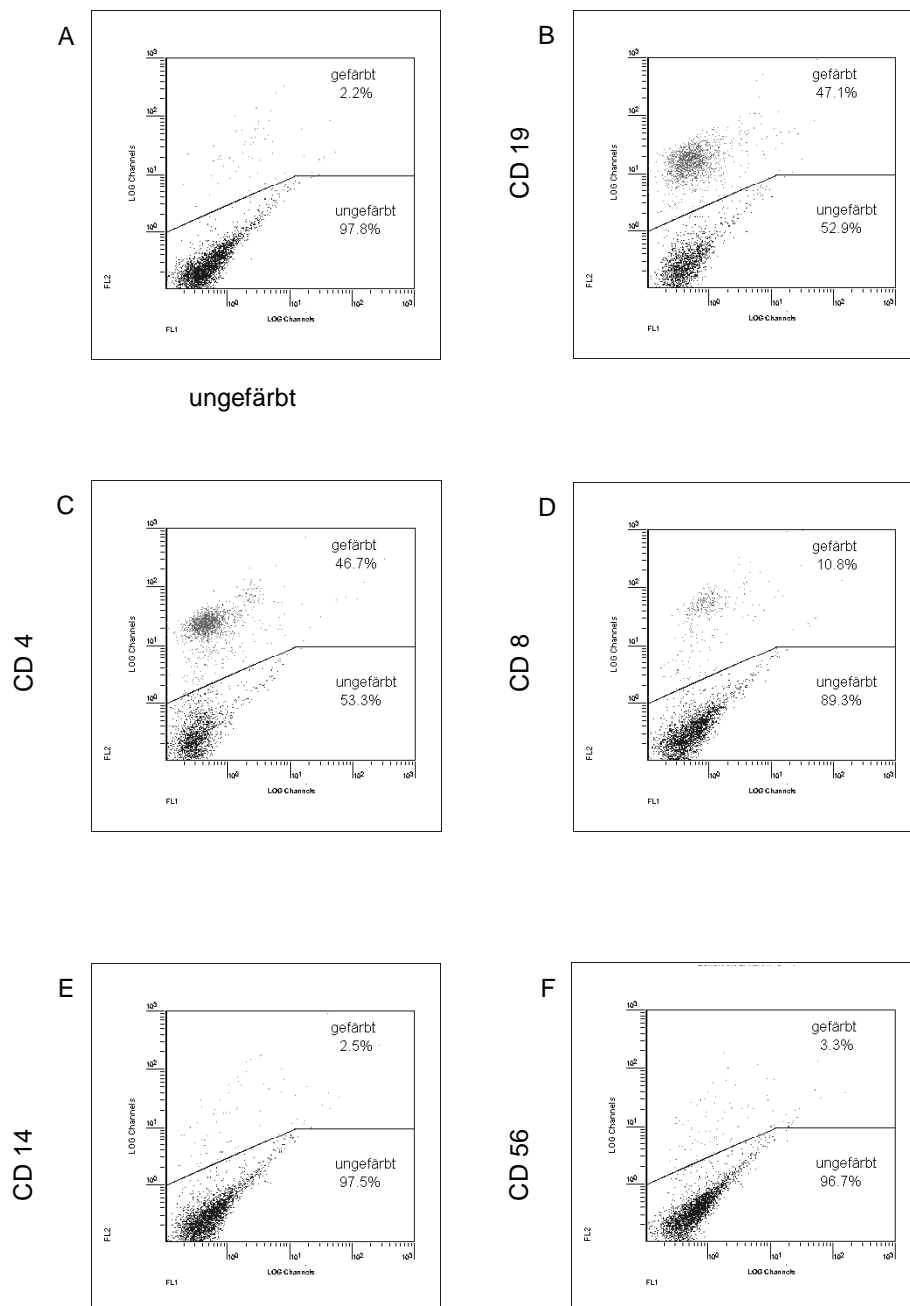


Abb 2: Darstellung der Zellverteilung in Tonsillen eines weiteren Spenders vor der B-Zell-Isolierung durch Färbung spezifischer Oberflächen-Antigene mittels FACS-Technik.  
A: Ungefärbte Zellen B: CD19-positive B-Lymphozyten C: CD4-positive T-Zellen D: CD8 T-Zellen E: CD14-gefärbte Monozyten/Makrophagen F: CD56-positive NK-Zellen.

### 3.1.1. Reinheit der B-Lymphozyten nach der Isolierung

Zur Ermittlung des Anteils der B-Lymphozyten in der Zellfraktion nach der Isolierung wurden B-Zell-spezifische Oberflächenantigene mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern nachgewiesen. Gewählt wurden das CD19, ein Ag, das vom Vorläufer- bis zum Plasmazellstadium auf den B-Lymphozyten vorhanden ist, das CD22, das auf reifen B-Zellen zu finden ist und das CD40, das auf antigenpräsentierenden Zellen zu finden ist (Kehry, M. R. 1996).

In Abbildung 3, Bild A, ist gezeigt, wie sich die B-Lymphozyten in ungefärbtem Zustand nach Größe und Granularität, d.h. Oberflächenbeschaffenheit, abbilden lassen. Bild B zeigt eine andere Geräteeinstellung, um die Schwellenwerte zwischen ungefärbten und gefärbten Zellen ermitteln zu können. In Bild C-E sind die Färbungen mit den B-Zell-Oberflächenantigenen dargestellt. Mehr als 98% (95,7% +2,7%) der isolierten Zellen ließen sich mit diesen verschiedenen B-Zell-spezifischen Ak anfärben. Bild F zeigt eine Doppelfärbung von CD19 und CD3, einem T-Zell-Oberflächenantigen, das sich hier jedoch nicht nachweisen ließ.

## Ergebnisse

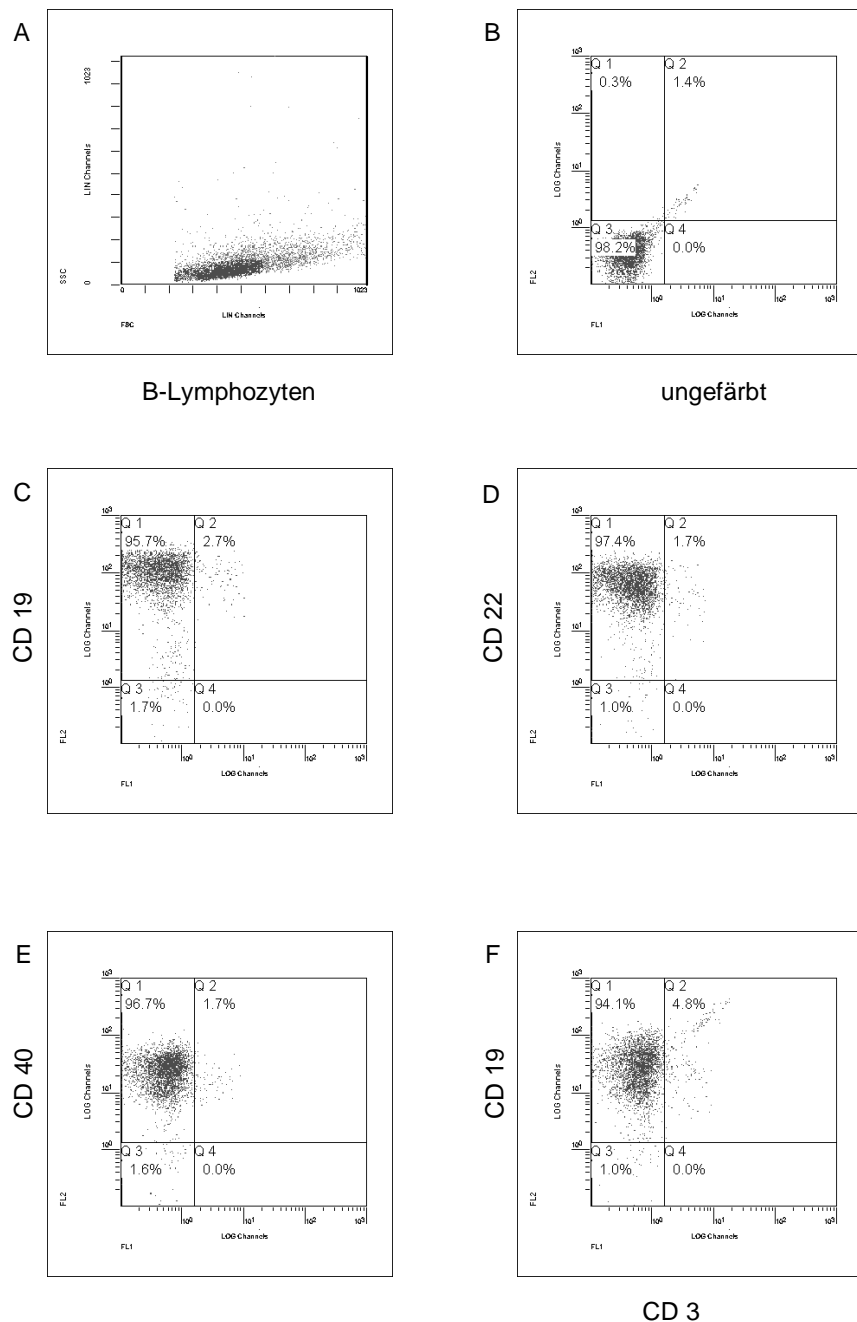


Abb 3: Darstellung der Reinheit der B-Lymphozyten nach der Isolierung durch Färbung verschiedener B-Zell-spezifischer Oberflächen-Antigene mittels FACS-Technik.  
A: Lymphozytenpopulation im FSC/SSC B: Darstellung ungefärbter Zellen, um die Schwellenwerte festzulegen C: CD19-positive Zellen D: CD22-positive Zellen E: CD40-positive Zellen F: Auftrennung der Lymphozytenpopulation in CD19-positive B- und CD3-positive T-Zellen.

### 3.2. Adsorption von Influenza A-Viren an B-Lymphozyten

Um Aussagen über die Wechselwirkung zwischen B-Lymphozyten und Influenza-Viren machen zu können, ist es von Bedeutung, ob die Viren überhaupt in der Lage sind, an die Zellen anzudocken und anschließend auch einzudringen.

Ist gespaltenes HA in der Lage, an die Sialinsäurereste-Moleküle auf humanen B-Lymphozyten zu binden?

Zur Klärung dieser Frage wurden tonsilläre B-Zellen zusammen mit den Influenza Virus-Stämmen APR/8 und A2 inkubiert, nach verschiedenen Zeiten wurde CD19 zum Nachweis der B-Lymphozyten mit PE-markierten Ak angefärbt und gleichzeitig die Viren mit FITC-markierten Ak nachgewiesen. In Abbildung 4 und 5 wurde der zeitliche Verlauf der sehr starken Adsorption dieser Viren an die große Mehrheit der Zellen zwischen 1 h und 24 h nach Viruszugabe dargestellt. Der Anteil der CD19-positiven Zellen blieb nahezu konstant bei ca. 95% (y-Achse), wohingegen der Anteil der virusbeladenen Zellen bei APR/8 von 96% auf 84% und bei A2 von 95% auf 92% nach 24 h sank (x-Achse). Es läßt sich aus diesen Zahlenwerten jedoch noch nichts darüber aussagen, ob die Viren in die Zellen eindringen oder sich wieder von ihren Rezeptoren ablösen.

## Ergebnisse

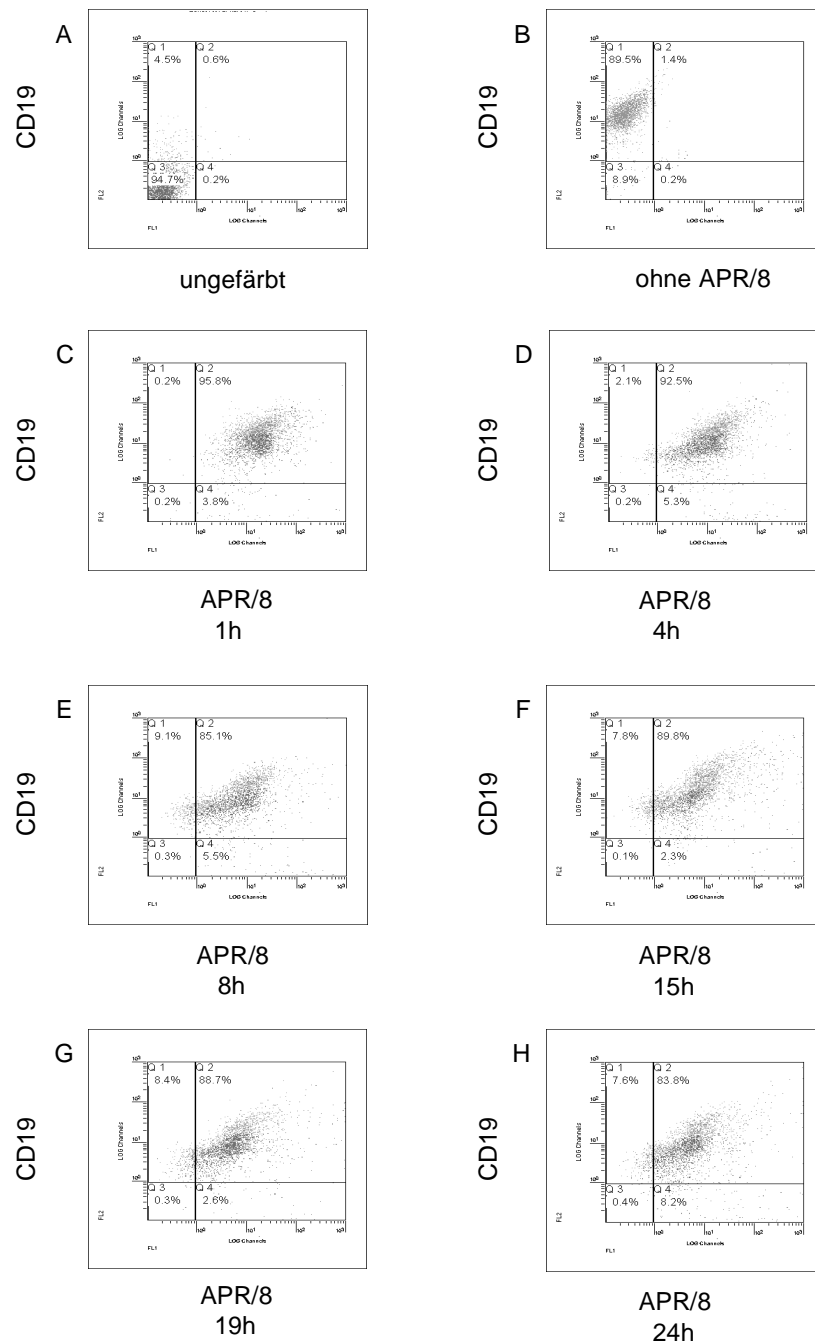


Abb 4: Darstellung der Bindungsfähigkeit von APR/8 an CD19-positive Zellen über einen bestimmten Zeitraum. B-Lymphozyten wurden mit PE-, Virus mit FITC-markierten Ak gefärbt.

A: ungefärbte Zellen, um die Schwellenwerte zu ermitteln B: B-Zellen ohne Viruszugabe C-H: doppelpositive Zellen von 1 h bis 24 h.

## Ergebnisse

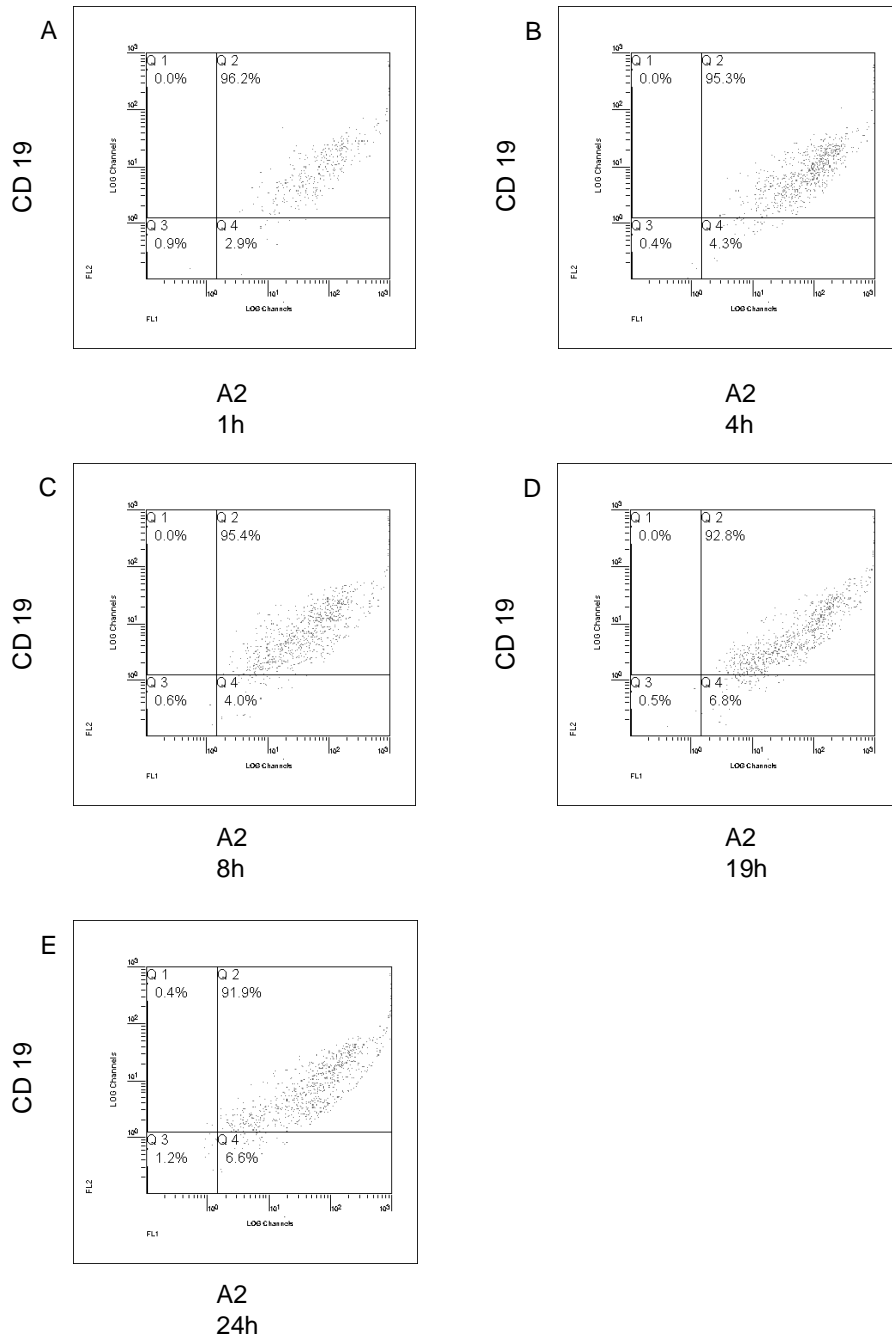


Abb 5: Darstellung der Bindungsfähigkeit von A2 an CD19-positive Zellen über einen bestimmten Zeitraum. B-Lymphozyten wurden mit PE-, Virus mit FITC-markierten Ak gefärbt.

A-E: doppeltpositive Zellen von 1 h bis 24 h.

### 3.3. Replikation von Influenza-Viren in B-Lymphozyten

#### 3.3.1. Nachweis von Virus-mRNA

Mittels PCR-Technik und spezifischen Primern für das während einer Infektion schon sehr früh gebildete Nukleoprotein (NP) und für das für die Infektiosität verantwortliche Matrixprotein (M) wurde untersucht, ob von mRNA umgeschriebene cDNA von Influenza-Virus APR/8 und A2 in den mit Viruspartikeln inkubierten Zellen zu finden war.

Da es sich bei Influenza-Viren um Negativ-Strang-RNA-Viren handelt, müssen virale Polymerasen diese RNA in eine Plus-Strang-mRNA umschreiben, die dann typische Strukturen wie 3'-Poly-A-Schwanz und 5'-Cap-Struktur erhält. Wird über Oligo-dT-Primer cDNA synthetisiert und sind die PCR-Primer komplementär zum Plus-Strang, wird eindeutig virale mRNA nachgewiesen. Die Primer waren so gewählt worden, das ein 500 bp-Fragment für das NP und ein 800 bp-Fragment für das M entstanden ist. Außerdem wurden 35 Amplifizierungszyklen gewählt.

In Abbildung 6 Bahn 1 wurde die cDNA der Zellkontrolle und in Bahn 3 und 4 die der Zellen, die mit 2 MOI APR/8 bzw. A2 inkubiert worden waren, aufgetragen. Bahn 2 war für diesen Versuch nicht von Belang.

Schon nach 30 min läßt sich bei den mit APR/8 inkubierten Zellen sowohl die cDNA für NP als auch die für M nachweisen, bei den mit A2 inkubierten Zellen nach 3 h. Des weiteren ist zu beobachten, daß die cDNA für NP stärker exprimiert wurde als die des M. Auch nach 24 h ist die cDNA noch gut sichtbar. Im obersten Bildteil ist die 300 bp lange cDNA für GAPDH dargestellt, um zu zeigen, daß überall ungefähr gleichviel cDNA aufgetragen wurde, da es sich beim Gen für die GAPDH um ein sogenanntes „housekeeping gene“ handelt, das konstitutiv und nicht reguliert exprimiert wird.



## Ergebnisse

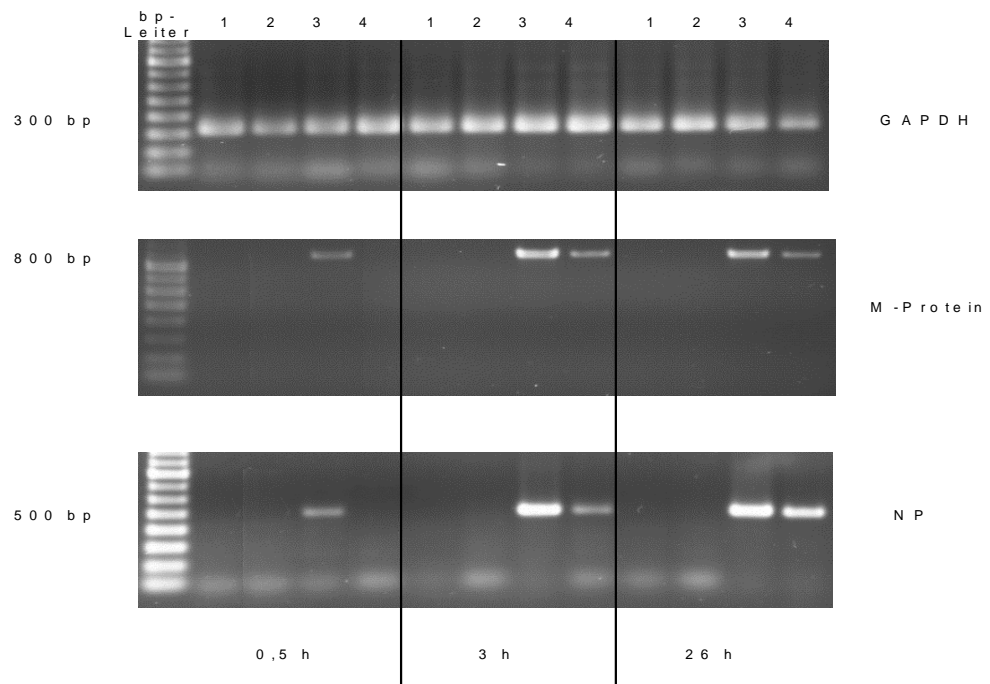


Abb 6: Nachweis viraler mRNA für die beiden Virusproteine M und NP mit Hilfe der RT-PCR. Im obersten Bild ist die cDNA für GAPDH dargestellt.

1: Zellkontrolle 3: 2 MOI APR/8 4: 2 MOI A2. Bahn 2 war in diesem Versuch nicht relevant.

Gewählt wurden 35 Amplifizierungszyklen.

### 3.3.2. Synthese von Virusproteinen

Zum Nachweis einer Neubildung von Viruspartikeln in B-Lymphozyten wurde die Synthese von APR/8-Proteinen durch radioaktive Markierung neugebildeter Proteine sowohl in den Zell-Linien IM-9 und Raji als auch in tonsillären B-Zellen untersucht.

In den als positive Kontrolle mitgeführten MDCK-Zellen wurden die viralen Proteine als deutliche Banden sichtbar (vergleiche Abb. 7, 8 und 9).

## Ergebnisse

In Bahn 1 wurde ein Molekulargewichts-Marker (MGM) aufgetragen, in Bahn 2 die positive und in Bahn 3 die negative Kontrolle. Bahn 4, 6 und 8 zeigt die jeweils verwendeten Zellen ohne Zugabe von Virus, Bahn 5, 7 und 9 jeweils die nach Zugabe von 2 MOI APR/8. Die radioaktive Markierung erfolgte über einen Zeitraum von 1,5 h und war nach 4 h, nach 8 h und nach 24 h erfolgt.

Bei allen drei Zellarten waren die ersten neu entstandenen Proteine schon nach 4-5,5 h nach Viruszugabe im Gel zu erkennen. Bei den Zell-Linien kam es zu einem Proteinmaximum zum Zeitpunkt von 8-9,5 h, wohingegen in den primären tonsillären Zellen das Maximum erst nach 24-25,5 h erreicht wurde.

Zu sehen ist außerdem, daß bei den verwendeten Linien ungefähr gleichviel NP wie M entstanden ist. Bei den primären Zellen ist um ein Vielfaches weniger an M-Protein entstanden, das einen entscheidenden Einfluß auf die Infektiosität der entstehenden Viruspartikel ausübt.

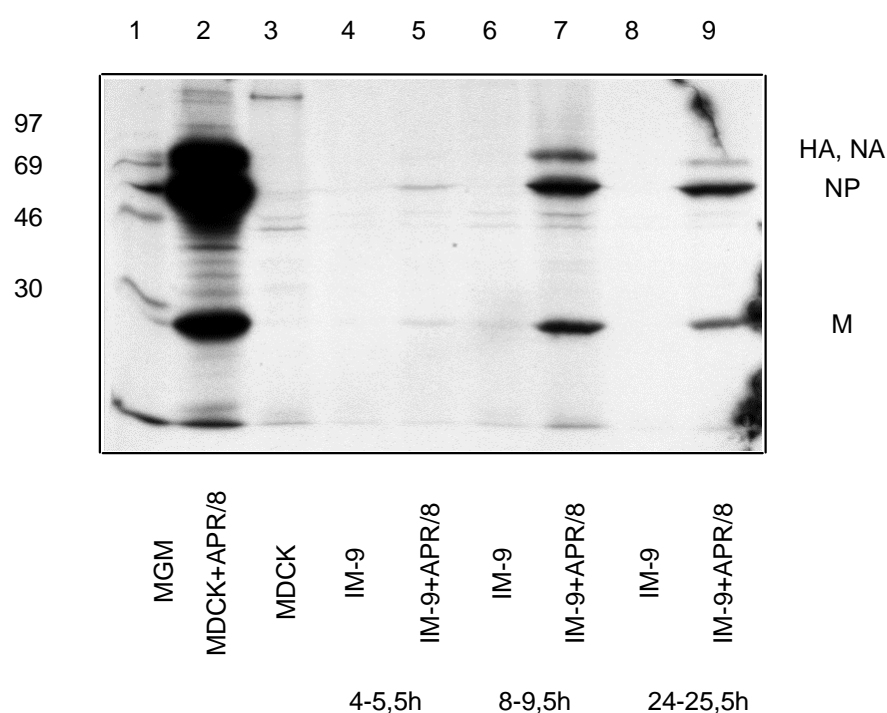


Abb 7: SDS-PAGE viraler Proteine aus IM-9-Zellen.

Markierung viraler Proteine in IM-9-Zellen mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin nach 4-5,5 h, 8-9,5 h und 24-25,5 h nach Infektion mit 2 MOI APR/8.

MGM: Molekulargewichtsmarker

## Ergebnisse

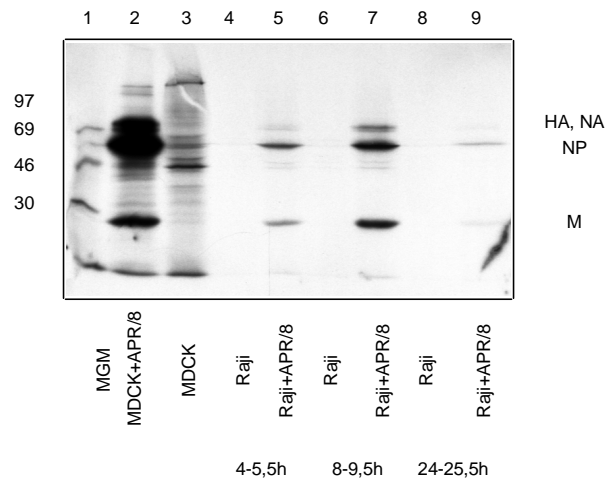


Abb 8: SDS-PAGE viraler Proteine aus Raji-Zellen.

Markierung viraler Proteine in Raji-Zellen mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin nach 4-5,5 h, 8-9,5 h und 24-25,5 h nach Infektion mit 2 MOI APR/8.

MGM: Molekulargewichtsmarker

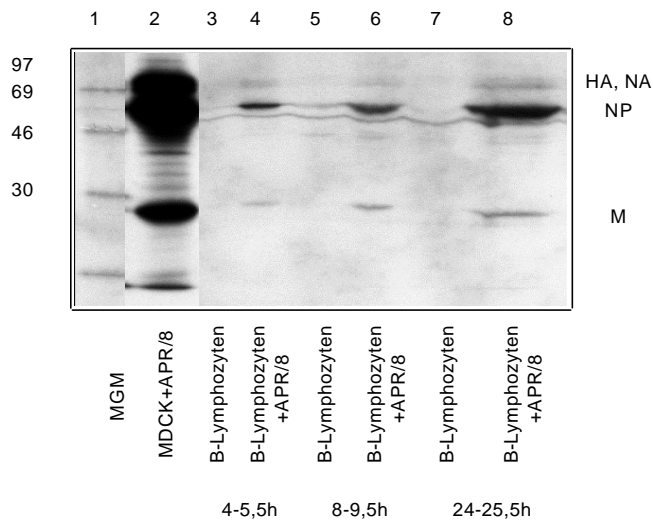


Abb 9: SDS-PAGE viraler Proteine aus B-Lymphozyten.

Markierung viraler Proteine in CD19-Zellen mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin nach 4-5,5 h, 8-9,5 h und 24-25,5 h nach Infektion mit 2 MOI APR/8.

MGM: Molekulargewichtsmarker

## Ergebnisse

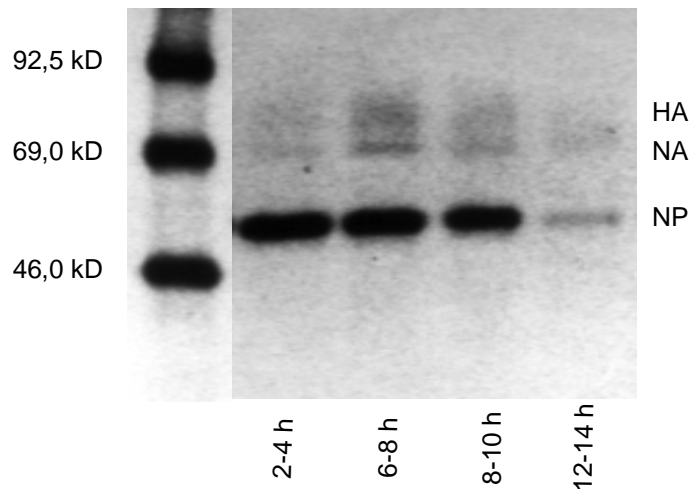


Abb 10: SDS-PAGE viraler Proteine aus humanen Monozyten.

Markierung viraler Proteine in Monozyten mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin nach 2-4 h, 6-8 h, 8-10 h und 12-14 h nach Infektion mit 2 MOI APR/8.

In Abb. 10 konnte gezeigt werden, daß die Virusprotein-Synthese in humanen Monozyten einen völlig anderen zeitlichen Verlauf nahm, als die der B-Lymphozyten: Die maximale Protein-Synthese fand nach 6-8 h statt und nach 12-14 h, wo man das Maximum in den B-Zellen fand, wurden so gut wie keine Virusproteine neugebildet. So läßt sich zumindest ausschließen, daß es sich um eine monozytäre Verunreinigung handelte, die die Proteine hervorbrachte, da nach 24 h schon längst keine neuen Virusproteine aus den lysierten Monozyten mehr freigesetzt werden konnten.

### 3.3.3. Freisetzung infektiöser Viruspartikel

Die Menge an freigesetztem Virus wurde im Plaquetest untersucht, indem Überstände von APR/8- und A2-infizierten B-Lymphozyten, die zu unterschiedlichen Zeiten geerntet worden waren, auf MDCK-Zellen übertragen wurden. Diese Zellen zeigen unter einer Agarschicht nach 2-3 Tagen Plaquebildung, wenn im Zellüberstand infektiöse Viruspartikel enthalten sind. Um zu überprüfen, ob auch nicht-infektiöse Viruspartikel entstanden waren,

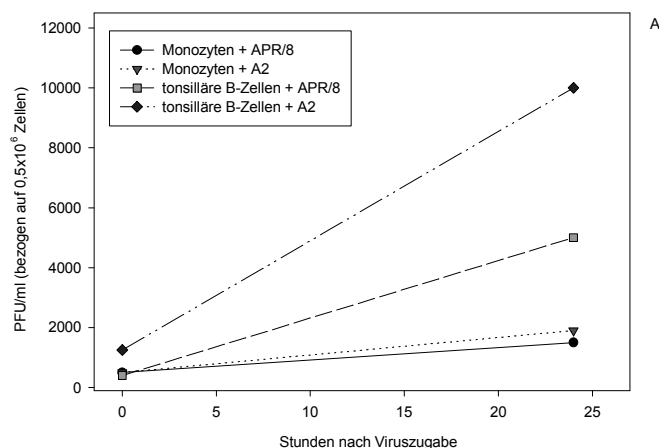
## Ergebnisse

wurden die Überstände mit Trypsin behandelt, um dadurch künstlich die Spaltung des HA-Moleküls zu erzielen, was, wie beschrieben, eine notwendige Voraussetzung für die Infektiosität eines Influenza-Virus-Partikels ist.

Die Zellen wurden mit 2 PFU Virus/Zelle infiziert, was bedeutet, daß auf  $0,5 \times 10^6$  Zellen  $10^6$  Viruspartikel eingesetzt wurden. Die entstandenen Viruspartikel sind nur ein Bruchteil dessen, was zur Infektion eingesetzt worden war.

In Abb 11 A wurde die Freisetzung infektiöser APR/8- und A2-Viruspartikel aus Monozyten und tonsillären B-Zellen verglichen, in Bild B die APR/8-Freisetzung aus peripheren und tonsillären B-Lymphozyten und schließlich in Bild C die Freisetzung infektiöser A2-Viruspartikel aus tonsillären B-Zellen mit und ohne Trypsinbehandlung. Die Werte sind jeweils auf  $0,5 \times 10^6$  Zellen bezogen.

Die Freisetzung von Viruspartikeln aus B-Zellen und Monozyten unterscheidet sich doch beträchtlich (Bild A). B-Lymphozyten setzten ungefähr doppelt so viele neugebildete APR/8- und fünfmal so viele A2- Virus-Partikel frei. Tonsilläre B-Zellen setzen ca. 100x mehr neugebildete APR/8-Viruspartikel frei als periphere Zellen (Bild B). Die Virusfreisetzung aus Monozyten ist nahezu die gleiche, gleichgültig, ob APR/8 oder A2 eingesetzt wird, wohingegen B-Zellen 10x mehr A2-Viruspartikel freisetzen als APR/8 (Bild A). Behandelt man zudem noch den Zellkulturüberstand mit Trypsin, läßt sich die Virusrate der A2-Freisetzung noch 4x erhöhen, was darauf hinweist, daß auch sehr viele nicht-infektiöse Viruspartikel entstanden waren (Bild C).



## Ergebnisse

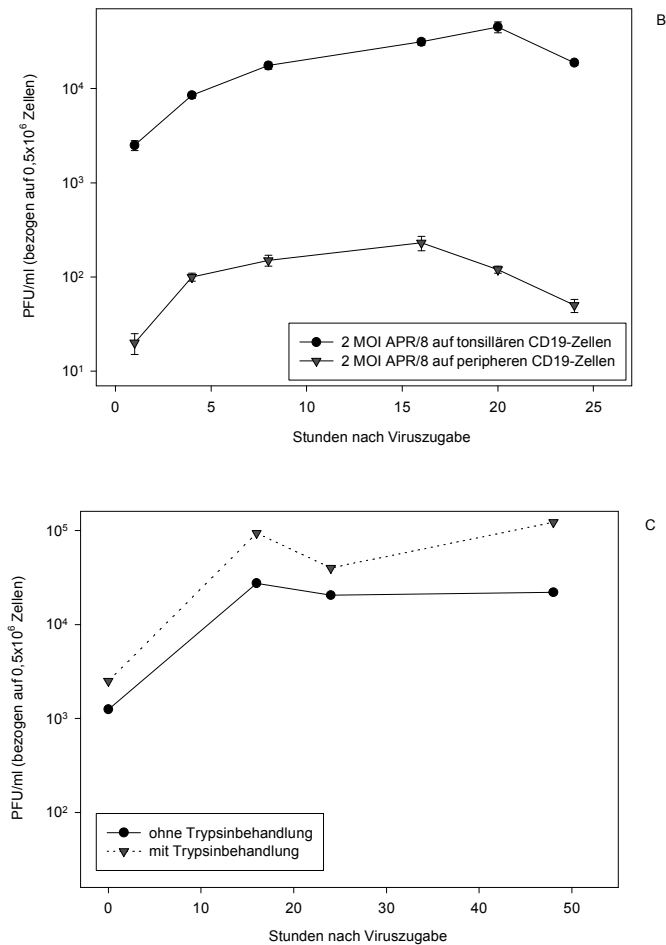


Abb 11: Freisetzung neugebildeter Viruspartikel, nachgewiesen im Plaquetest auf MDCK-Zellen. Im Vergleich werden gezeigt: Bild A: Monozyten und tonsilläre B-Lymphozyten infiziert jeweils mit 2 MOI APR/8 bzw. A2, Bild B: periphere und tonsilläre B-Zellen nach APR/8-Infektion, Bild C: tonsilläre B-Lymphozyten nach A2-Infektion, wobei die Zellkulturüberstände mit und ohne Trypsinbehandlung in den Plaquetest eingesetzt wurden

### 3.4. Vitalität der B-Zellen

#### 3.4.1. Nachweis über Trypanblaufärbung

Bei Trypanblau handelt es sich um einen Farbstoff, der tote Zellen anfärben kann, weil die nicht mehr funktionierenden Ionenpumpen die eindiffundierenden Farbmoleküle nicht mehr aus der Zelle hinaustransportieren können.

## Ergebnisse

---

Die Werte wurden mikroskopisch ermittelt, indem die Zellsuspensionen 1:2 mit Trypanblau verdünnt und die Zellen in der Neubauer-Kammer ausgezählt wurden.

Verglichen wurden die Werte für von APR/8 und A2 infizierten Zellen mit den Werten der Kontrollzellen, wobei für die Virusinfektion sowohl aktives als auch UV-inaktiviertes Virus verwendet worden war. Abbildung 12 zeigt, daß die Vitalität virusinfizierter Zellen nach dreitägiger Inkubation nur geringfügig unter der von Kontrollzellen liegt, was bedeutet, daß es sich hier um keine lytische Infektion der Zellen handelt.

Meine Ergebnisse zur B-Zellstimulation oder Zytokin-Freisetzung lassen sich folglich nicht auf erniedrigte Zellzahlen im Versuchsablauf zurückführen.

## Ergebnisse

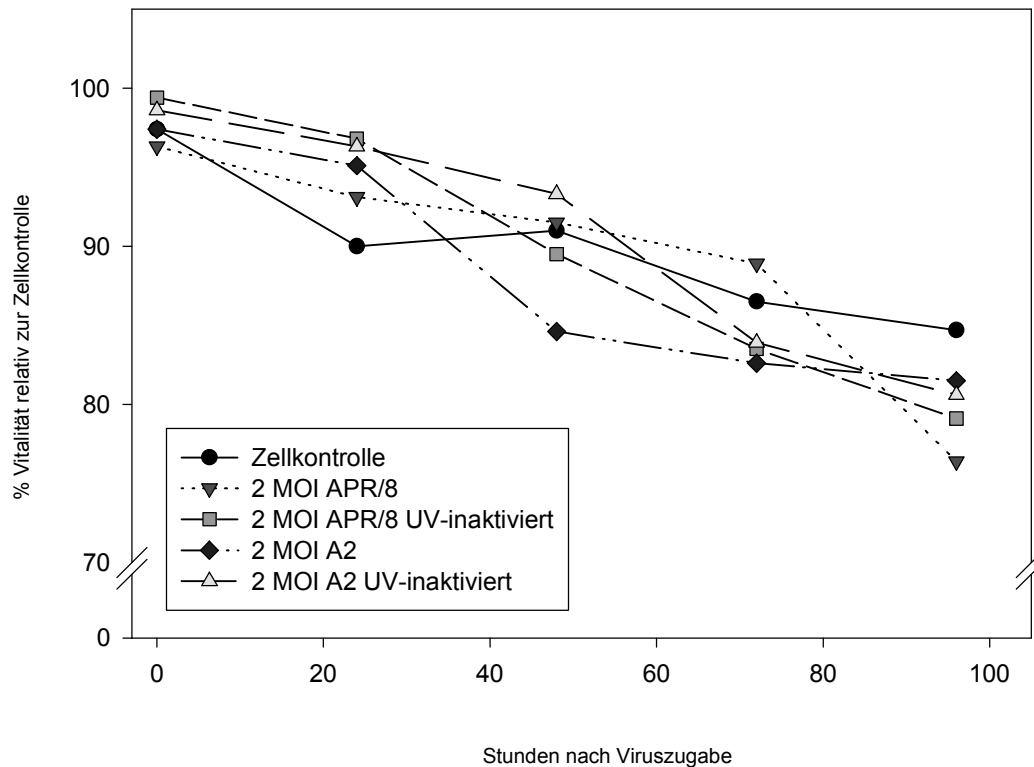


Abb 12: Trypanblaufärbung zum Nachweis der Vitalität der B-Lymphozyten. Als Vergleichswert gilt der Wert der Zellkontrolle zum Zeitpunkt 0 h.

### 3.4.2. LDH-Nachweis

Da es sich bei der Trypanblaufärbung um eine subjektive Zellauszählung handelt, wurde ein Parameter im Zellüberstand untersucht, der nur nach Lyse der Zellen aus den Zellen austritt, die LDH. Auch hier wurden die Werte der Kontrollzellüberstände mit denen der virusinfizierten Zellen verglichen, wobei erneut APR/8 und A2 in aktivem und UV-inaktiviertem Zustand eingesetzt worden war. Als 100%-Bezugspunkt wurde die LDH-Gesamtmenge zum Zeitpunkt 0 h innerhalb der Zellen gesetzt, die durch Lyse der Zellen freigesetzt worden war.

Abbildung 13 zeigt, wie auch die Trypanblaufärbung, daß sich die LDH-Freisetzung innerhalb eines Zeitraumes von 96 h aus Kontrollzellen und virusinfizierten Zellen nicht unterscheidet.



## Ergebnisse

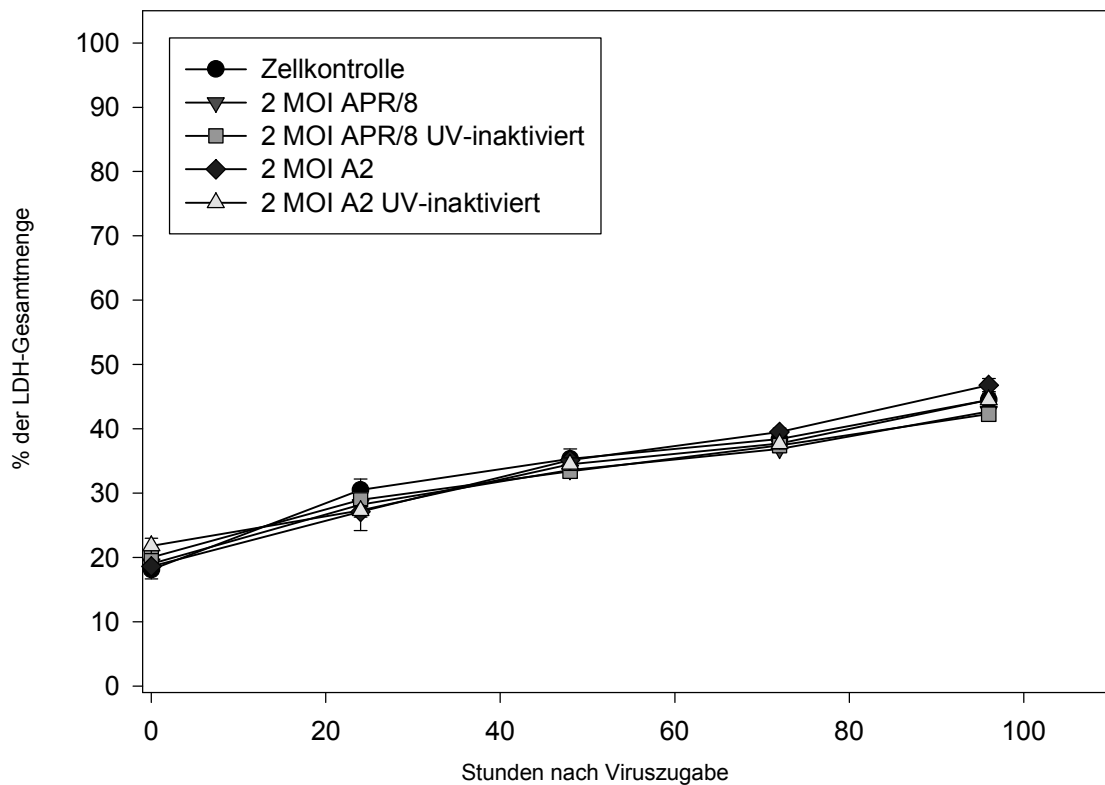


Abb 13: LDH-Messung im Zellkulturüberstand zur Überprüfung der Vitalität der CD19-positiven Zellen. Die Werte beziehen sich auf die LDH-Gesamtmenge (Überstand und zytoplasmatische LDH) zum Zeitpunkt 0 h.

### 3.4.3. MTT-Assay

Obwohl die Vitalität der Zellen durch Virusinfektion nicht beeinträchtigt zu sein scheint, könnten dennoch Funktionen z. B. im Proteinsyntheseapparat verändert, d.h. eingeschränkt oder verbessert sein. Da stoffwechselaktive Zellen mit Hilfe ihrer mitochondrialen Dehydrogenase in der Lage sind, das Tetrazoliumsalz MTT in ein blaues, wasserunlösliches Formazanderivat zu reduzieren, dessen optische Dichte dem Anteil der lebenden stoffwechselaktiven Zellen direkt proportional ist, konnte mit dieser Methode die Aktivität von Kontrollzellen und virusinfizierten Zellen verglichen werden.

### 3.4.3.1. Stoffwechselaktivität von Raji-Zellen

In Abbildung 14 und 15 wurde die Stoffwechselaktivität von Raji-Kontroll-Zellen und Raji-Zellen, die mit aktivem und inaktiviertem APR/8 (Abb 14) bzw. A2 (Abb 15) infiziert worden waren, verglichen.

Die Aktivität steigt sowohl in den Kontroll-Zellen als auch in den Zellen, die mit inaktivierten Viren (APR/8 und A2) inkubiert worden waren im Laufe der Zeit auf Werte um 150% an, was sich vermutlich dadurch erklären läßt, daß sich diese Zellen stetig weiter teilen und somit natürlich auch die Menge an mitochondrialer Dehydrogenase ansteigt. Die Stoffwechsel-Aktivität der mit APR/8 oder A2 infizierten Zellen bleibt nahezu konstant auf 100%.

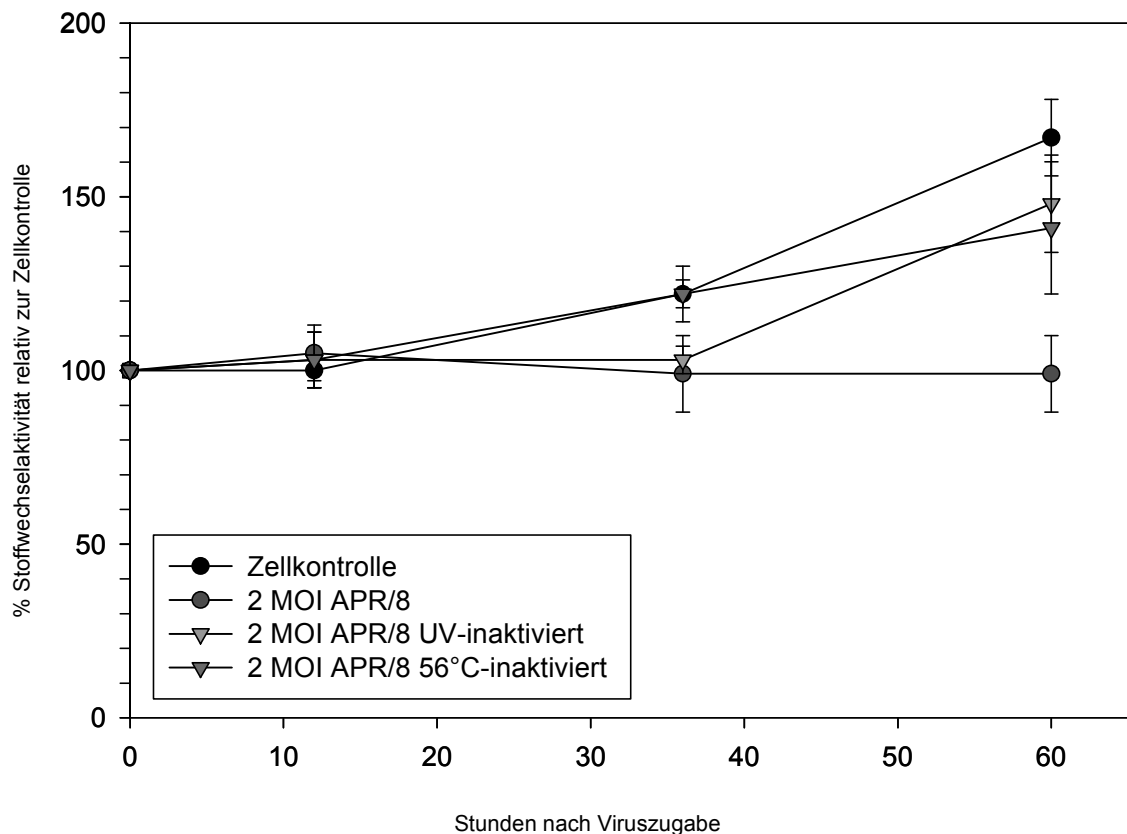


Abb 14: MTT-Test zur Darstellung der Stoffwechselaktivität von Raji-Zellen. Die MTT-Zugabe erfolgte jeweils 4 h vor Versuchsende. Vergleichend gezeigt werden Kontrollzellen und virusinfizierte Zellen. Eingesetzt wurden 2 MOI APR/8 in aktivem und auf verschiedene Weise inaktiviertem Zustand.

## Ergebnisse

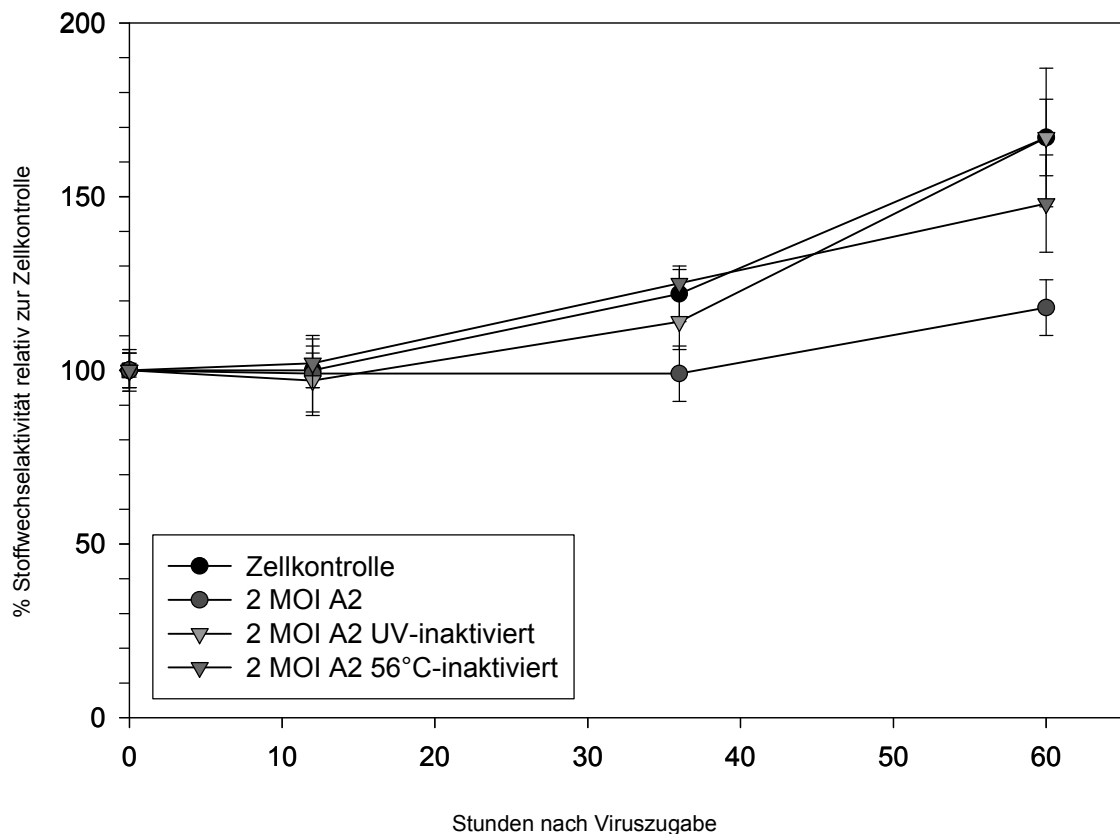


Abb 15: Darstellung der Stoffwechselaktivität von Raji-Zellen mit Hilfe des MTT-Tests. Die MTT-Zugabe erfolgte 4 h vor Versuchsende.

Vergleichend gezeigt werden Kontrollzellen und virusinfizierte Zellen. Eingesetzt wurden 2 MOI A2 in aktivem und auf verschiedene Weise inaktiviertem Zustand.

### 3.4.3.2. Stoffwechselaktivität von IM-9-Zellen

In Abbildung 16 und 17 wurde die Stoffwechselaktivität von IM-9-Kontroll-Zellen und IM-9-Zellen, die mit aktivem und inaktiviertem APR/8 (Abb 16) bzw. A2 (Abb 17) infiziert worden waren, verglichen.

Die Aktivität steigt sowohl in den Kontroll-Zellen als auch in den Zellen, die mit inaktivierten Viren (APR/8 und A2) inkubiert worden waren im Laufe der Zeit auf Werte um 130-140% an, was sich vermutlich ebenso wie in 3.4.3.1. erklären lässt. Die Aktivität der Zellen, die mit aktiven Viren inkubiert worden waren, steigt nicht so stark an, die Werte bleiben bei ca. 100%.

## Ergebnisse

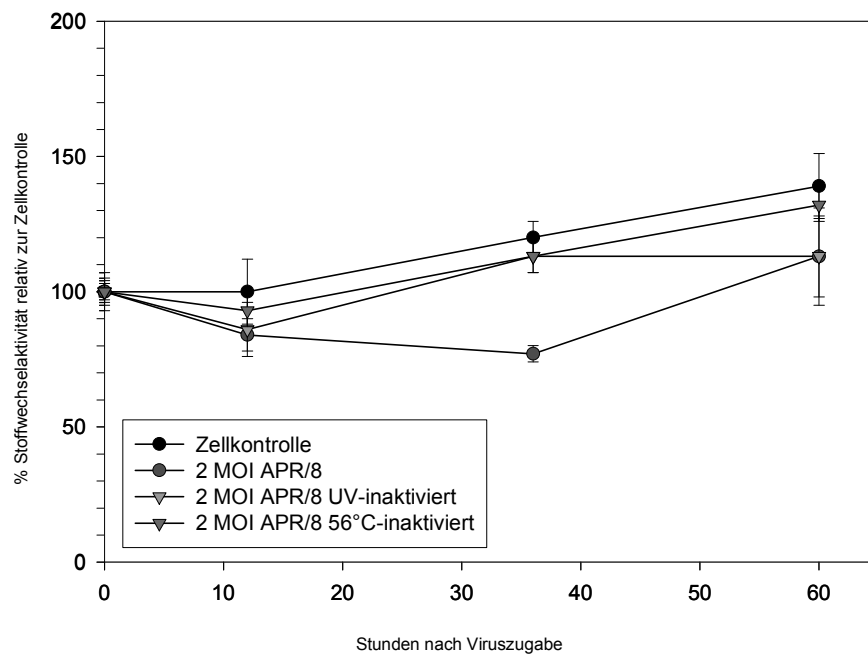


Abb 16: Darstellung der Stoffwechselaktivität von IM-9-Zellen mit Hilfe des MTT-Tests. Die MTT-Zugabe erfolgte 4 h vor Versuchsende.

Vergleichend gezeigt werden Kontrollzellen und virusinfizierte Zellen. Eingesetzt wurden 2 MOI APR/8 in aktivem und auf verschiedene Weise inaktiviertem Zustand.

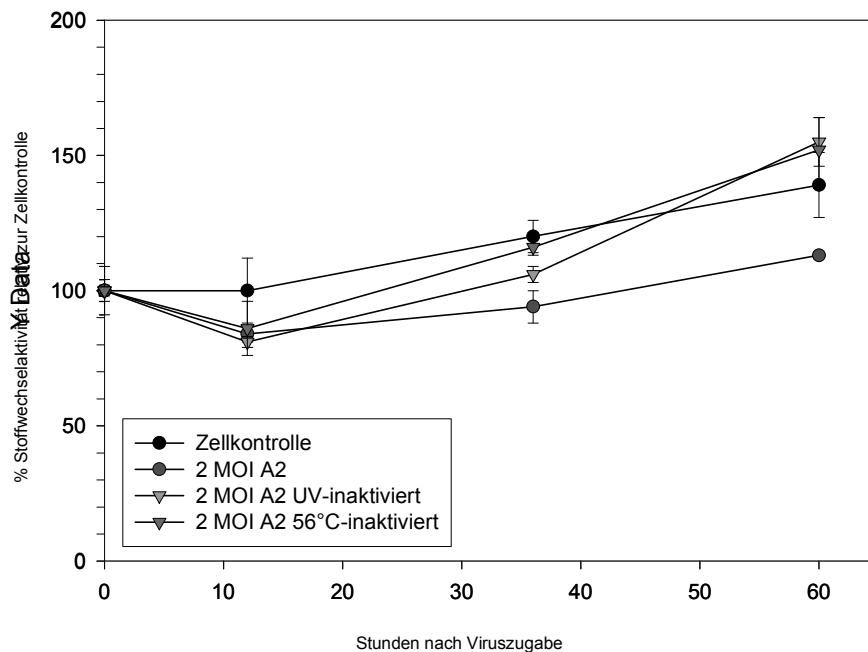


Abb 17: Darstellung der Stoffwechselaktivität von IM-9-Zellen mit Hilfe des MTT-Tests. Die MTT-Zugabe erfolgte 4 h vor Versuchsende.

Vergleichend gezeigt wurden Kontrollzellen und virusinfizierte Zellen. Eingesetzt wurden 2 MOI A2 in aktivem und auf verschiedene Weise inaktiviertem Zustand.

## Ergebnisse

### 3.4.3.3. Stoffwechselaktivität peripherer B-Zellen und Monozyten

Die Stoffwechselaktivität peripherer B-Lymphozyten nimmt im Vergleich zu der von Monozyten im Verlauf von drei Tagen nur geringgradig von 100% auf 75% ab, wohingegen die der Monozyten fast auf 0% fällt, da diese Zellen das Virus durch Lyse freisetzen, so daß sie dabei zugrundegehen.

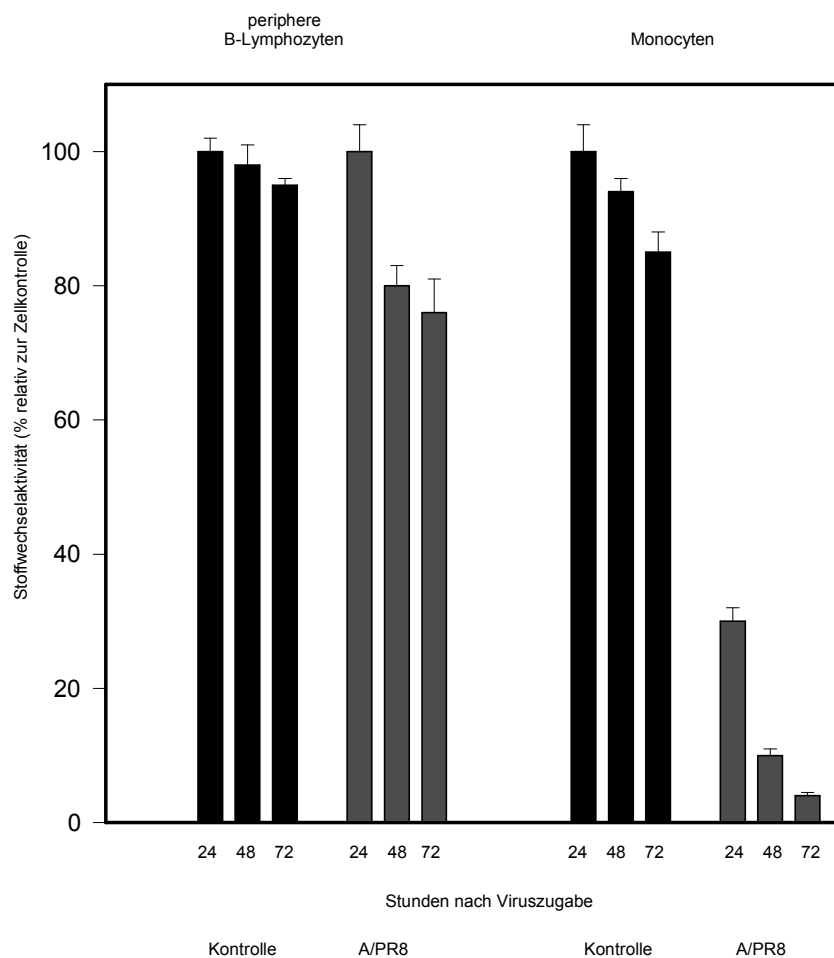


Abb 18: Darstellung der Stoffwechselaktivität peripherer B-Zellen und Monozyten im Vergleich ermittelt im MTT-Test. Die MTT-Zugabe erfolgte jeweils 4 h vor Versuchsende. Im Vergleich zu sehen sind Kontrollzellen und mit 2 MOI APR/8 infizierte Zellen.

### 3.4.3.4. Darstellung der Stoffwechselaktivität tonsillärer B-Zellen

Um zusätzlich zur Vitalität unter Viruseinfluß Aussagen über die Stoffwechselaktivität der Zellen machen zu können, wurde im MTT-Test die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase untersucht, damit eventuell einige Ergebnisse der Funktions- oder Synthese-Leistungen in B-Lymphozyten beurteilt werden können.

Zusätzlich zu den aktiven Viren APR/8 und A2 wurden diese Virusstämme auf unterschiedliche Weise inaktiviert und so zusammen mit den Zellen inkubiert. Die Abbildungen 19 (APR/8) und 20 (A2) zeigen den Verlauf der Stoffwechselaktivität über drei Tage. Die Kurven der unterschiedlichen Meßparameter unterscheiden sich alle nicht wesentlich; aktives APR/8 zeigte bei diesem Spender eine etwas reduzierte Aktivität auf 80% am dritten Tag.

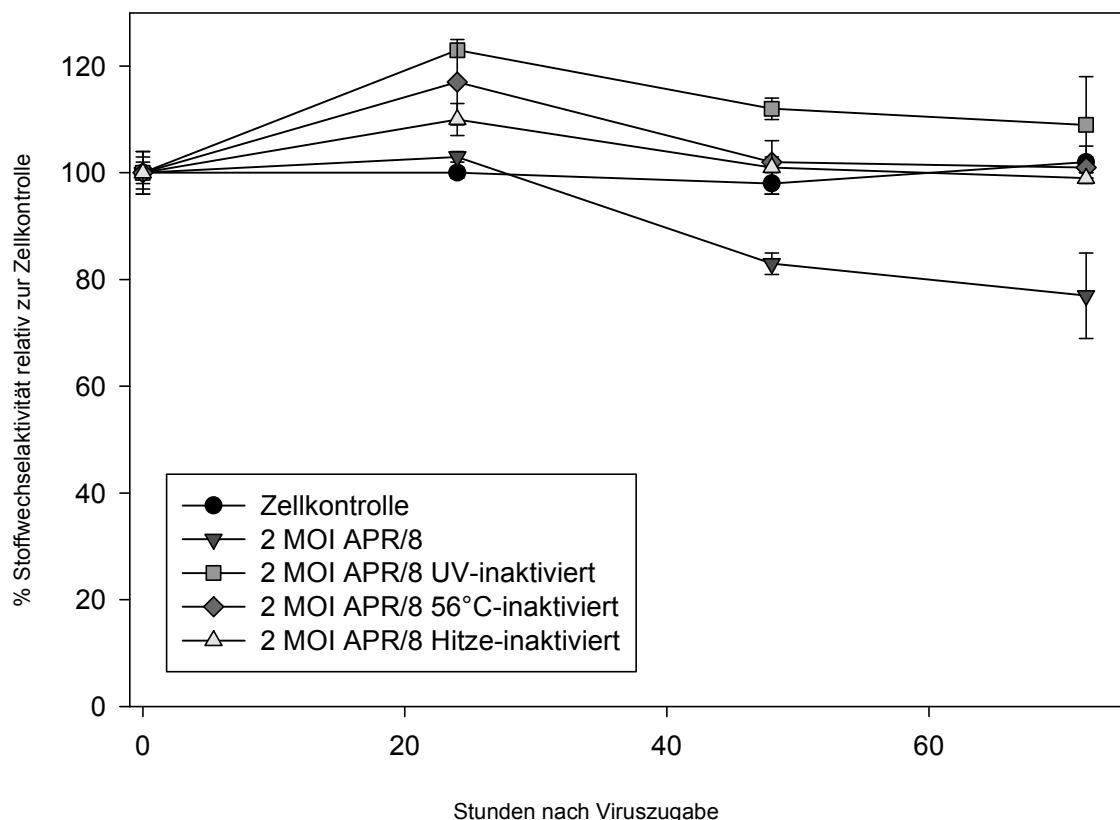


Abb 19: Stoffwechselaktivität tonsillärer B-Lymphozyten ohne Viruszugabe oder nach Infektion der Zellen mit 2 MOI APR/8 in aktivem oder auf verschiedene Weise inaktiviertem Zustand. Die MTT-Zugabe erfolgte jeweils 4 h vor Versuchsende.

## Ergebnisse

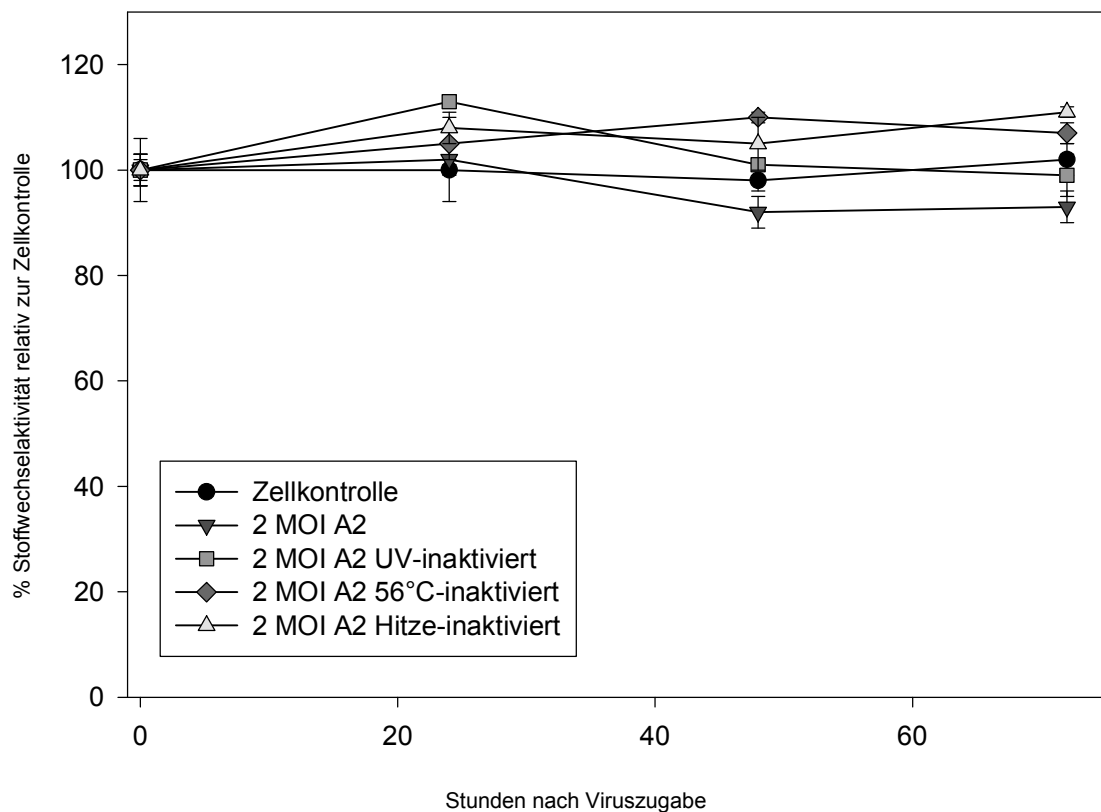


Abb 20: Stoffwechselaktivität tonsillärer B-Lymphozyten ohne Viruszugabe oder nach Infektion der Zellen mit 2 MOI A2 in aktivem oder auf verschiedene Weise inaktiviertem Zustand. Die MTT-Zugabe erfolgte jeweils 4 h vor Versuchsende.

In Abbildung 21 A und B wurden noch weitere Parameter (andere Virusstämme und isoliertes HA von A2) eingesetzt und auf Dosisabhängigkeit untersucht. Gewählt wurden 1,2 und 5 MOI an Virus- oder anderer Suspension. Die Stoffwechselaktivität nahm bei allen Virusstämmen relativ zur Zellkontrolle leicht zu, gleichgültig welche Dosis eingesetzt worden war. Die Aktivität nach der Zugabe von HA nahm leicht ab. Da jedoch die zugehörige HA-Kontrolle die gleichen Werte zeigte, war diese Abnahme ohne Bedeutung.

## Ergebnisse

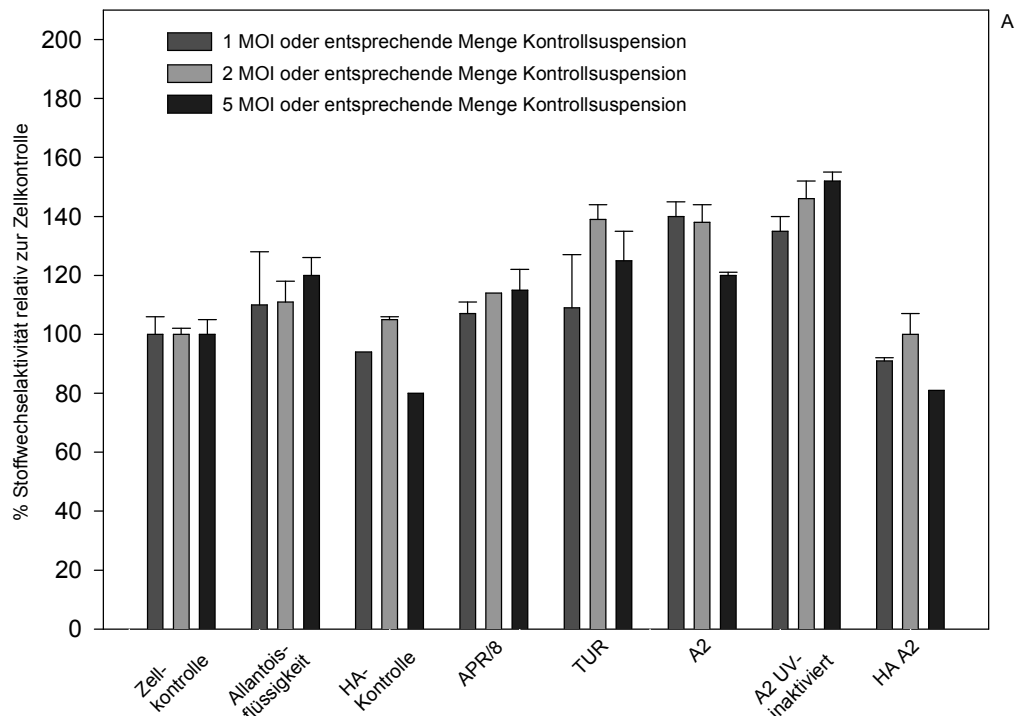


Abb 21 A: Stoffwechselaktivität tonsillärer B-Zellen zum Zeitpunkt 72 h nach Stimulation mit Virus (1,2 oder 5 MOI), Kontrollsuspensionen oder isoliertem Virushämagglutinin von A2. Die Aktivität wurde mit Hilfe von MTT bestimmt, das 4 h vor Versuchsende dem Medium zugesetzt worden war.

In Abbildung 21 B sind die entsprechenden Werte zu Abb 21 A unter gleichzeitiger Inkubation mit dem Mitogen PWM dargestellt. Dieser Versuchsansatz erfolgte im Hinblick auf die nachfolgend abgebildeten Versuche (vgl. Abb. 24 und 25): In den Proliferationstests wurde das B-Zell-Mitogen PWM als positive Kontrolle eingesetzt, da man weiß, daß humane B-Lymphozyten auf Stimulation mit diesem Mitogen mit Proliferation antworten. Um einen Einblick in die Stoffwechselleistung unter gleichzeitiger Mitogen-Stimulation zu bekommen, wurde ein MTT-Test durchgeführt. Es gilt im wesentlichen das gleiche wie in Abb 21 A: Die Werte nach Zugabe von HA gingen etwas zurück, jedoch auch wieder parallel in der Kontrolle, was deshalb ohne Bedeutung war. Die Aktivität war unter Verwendung von Virus leicht erhöht, mit Ausnahme beim APR/8, wo die Werte auf unter 50% der Zellkontrolle sanken.



## Ergebnisse

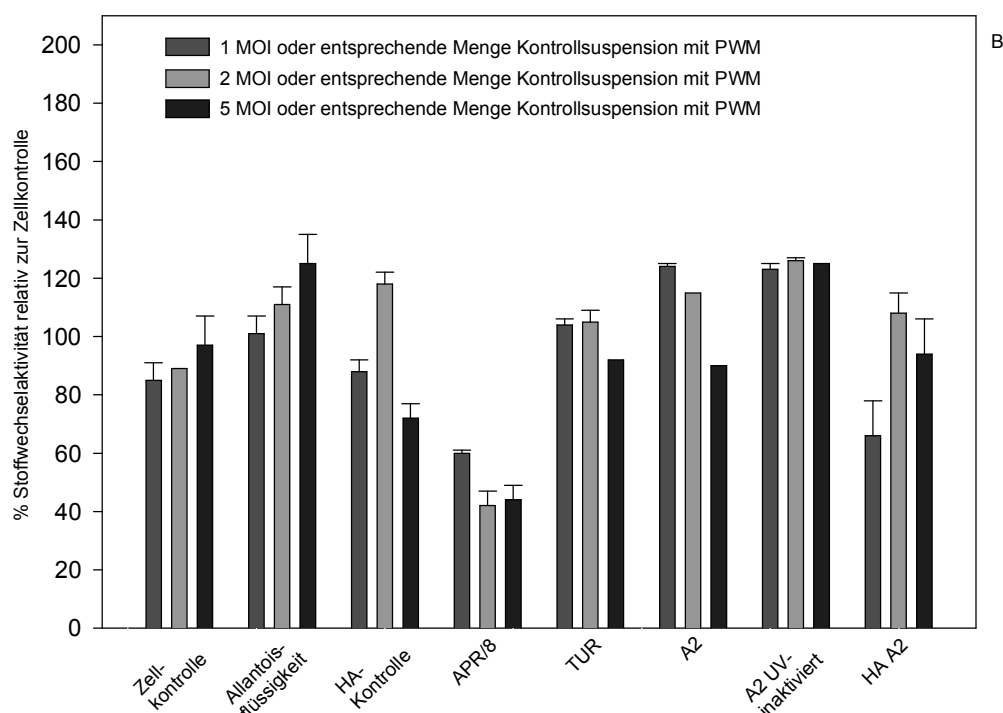


Abb 21 B: Stoffwechselaktivität tonsillärer B-Zellen zum Zeitpunkt 72 h nach Stimulation mit Virus (1,2 oder 5 MOI), Kontrollsuspensionen oder isoliertem Virushämagglutinin von A2 unter gleichzeitiger Gabe von 10 µg/ml PWM. Die Aktivität wurde mit Hilfe von MTT bestimmt, das 4 h vor Versuchsende dem Medium zugesetzt worden war.

### 3.5. Proliferation der B-Lymphozyten

Die Proliferation der B-Lymphozyten nach Aktivierung unterliegt einer starken Kontrolle, da daraus nach geeigneter Weiterstimulierung die Plasmazellen hervorgehen können, die für die Antikörperproduktion, einer Reaktion des Körpers auf ein Immunogen, die, wenn sie unkontrolliert abläuft, mehr Schaden anrichtet als Nutzen bringt, verantwortlich sind. Man kennt Stoffe, sogenannte Mitogene, wie z.B. LPS in Mäusen oder PWM im humanen System, die in der Lage sind, B-Lymphozyten polyklonal zu stimulieren. Außerdem wurde an Mäuse-B-Zellen eine Proliferation nach Inkubation mit aktivem und UV-inaktiviertem Influenzavirus beobachtet, so daß hier untersucht wurde, ob diese Reaktion auch im humanen *in vitro*-System auftritt.

## Ergebnisse

Es wurde die Einbaurate des Thymidin-Analogons BrdU während der DNA-Verdopplung untersucht, indem 16h vor Versuchsende BrdU ins Medium zugegeben wurde, das dann über spezifische Ak in einem ELISA-System quantifiziert werden konnte.

### 3.5.1. Proliferation tonsillärer Zellen vor der B-Zell-Isolierung

Die Proliferation tonsillärer Lymphozyten wurde unter Verwendung polyklonaler B- und T-Zell-Stimuli und gleichzeitiger Inkubation mit 2 MOI APR/8 untersucht. Die Rate des BrdU-Einbaus stieg nach Inkubation mit dem B-Zell-Mitogen PWM auf einen dreimal so hohen Wert an, die T-Zell-Mitogene PHA und Con A blieben ohne Wirkung, da diese Werte den der Kontrolle nicht überschritten. Auch die Inkubation mit APR/8 veränderte die Reaktion der Zellen auf die Mitogengabe nicht.

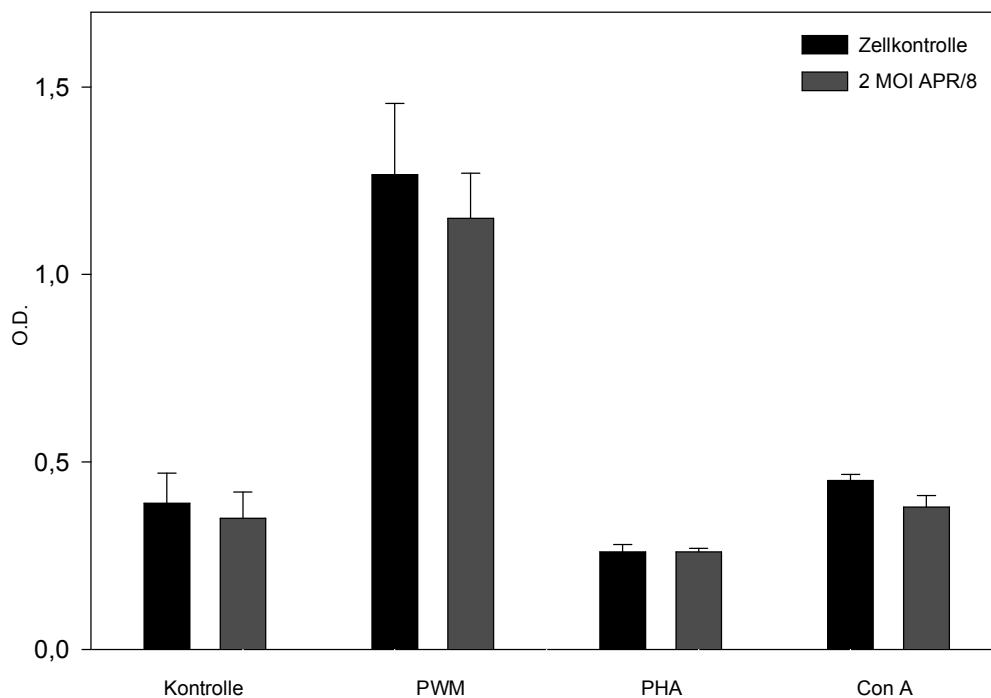


Abb 22: Nachweis der Zellproliferation durch Einbau von BrdU. Die BrdU-Zugabe erfolgte 16 h vor Versuchsende. Dargestellt sind nichtisolierte tonsilläre Zellen zum Zeitpunkt 72 h nach Stimulation mit 10 µg/ml PWM, 10 µg/ml PHA und 1 µg/ml Con A mit und ohne gleichzeitiger Zugabe von 2 MOI APR/8.

### 3.5.2. Proliferation isolierter B-Zellen

Aufgereinigte tonsilläre B-Lymphozyten wurden mit verschiedenen B- und T-Zell-Mitogenen inkubiert und gleichzeitig mit APR/8 inkubiert (Abb 23). Das Diagramm unterscheidet sich nicht wesentlich von Abb. 22, in der die T- und B-Lymphozyten im Gemisch betrachtet worden waren. Die Werte für die Kontrolle und die der Stimulation mit T-Zell-Mitogenen waren niedriger. Aber auch hier zeigte APR/8 nur eine marginale Wirkung.

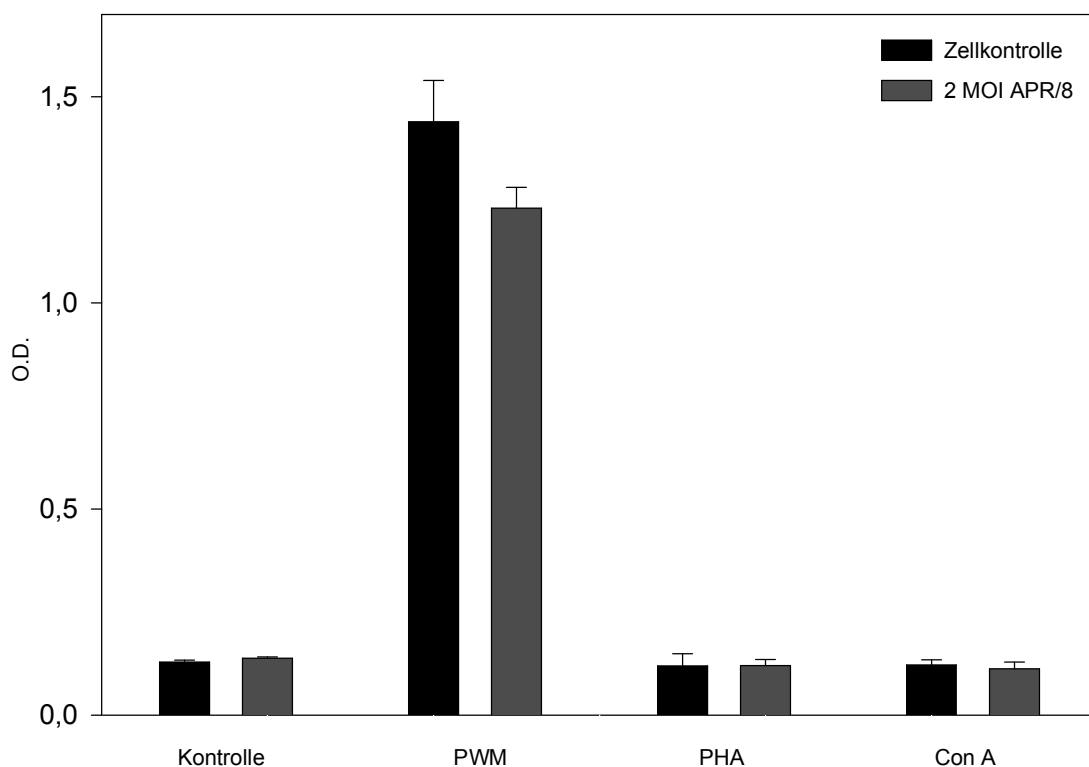


Abb 23: Nachweis der Zellproliferation durch Einbau von BrdU. Die BrdU-Zugabe erfolgte 16 h vor Versuchsende. Dargestellt sind isolierte tonsilläre B-Zellen zum Zeitpunkt 72 h nach Stimulation mit 10 µg/ml PWM, 10 µg/ml PHA und 1 µg/ml Con A mit und ohne gleichzeitiger Zugabe von 2 MOI APR/8.

### 3.5.2.1. Proliferation nach Zugabe verschiedener Influenza A-Viren ohne Zusatz von PWM

Da die Höhe der Proliferation von Mäuse-B-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Influenza A-Viren abhängig zu sein scheint von der HA-Struktur, wurden hier ebenfalls Viren mit unterschiedlichem HA eingesetzt (vgl. 2.1.3.). Die Viren wurden in unterschiedlichen Mengen (1,2 oder 5 MOI) eingesetzt, um eine Dosisabhängigkeit zu überprüfen.

Eine auffallende Proliferationserhöhung zeigte ausschließlich die Inkubation mit Influenza A2, einem H2N2-Virus. Die Werte waren sechsmal höher als die der Kontrolle. Die anderen Viren zeigten keine nennenswerte Erhöhung, bei TUR war bei der Verwendung von 5 MOI eher eine Erniedrigung des Wertes zu beobachten.

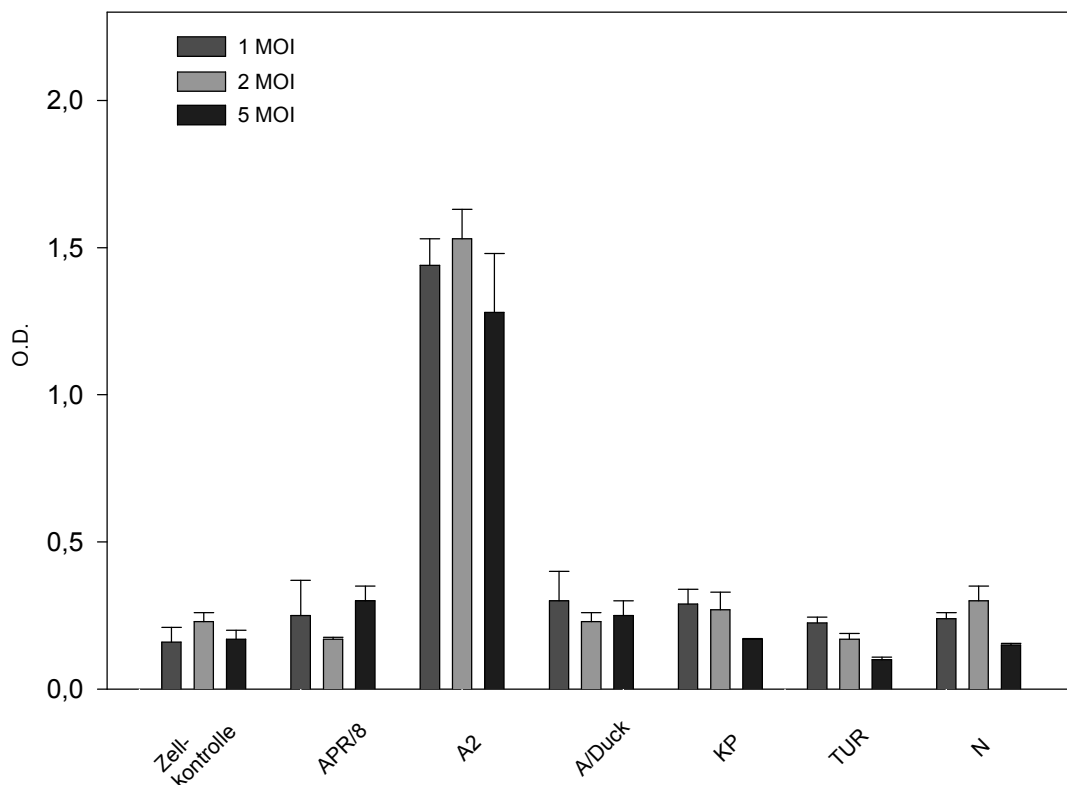


Abb 24: Darstellung der Zellproliferation tonsillärer B-Lymphozyten mit Hilfe des Einbaus von BrdU 72 h nach Viruszugabe. BrdU wurde 16 h vor Versuchsende dem Medium zugesetzt. Gezeigt werden Ergebnisse nach Infektion mit unterschiedlichen Influenza A-Viren in drei Dosierungen (1,2 oder 5 MOI).

### 3.5.2.2. Proliferation nach Zugabe verschiedener Influenza A-Viren unter Zusatz von PWM

Nach Mitogengabe stiegen die Werte um das neunfache des Wertes der nichtstimulierten Kontrollzellen an. Auch die Zellen, die gleichzeitig mit PWM und A2 inkubiert worden waren, zeigten keinen additiven Effekt. Bei diesem Spender war PWM in der Lage, die Zellen etwas stärker zu stimulieren, als das Influenza-Virus A2 (O.D. nach A2-Gabe 1,5; nach PWM-Stimulation O.D. 2,0). TUR schien in der Lage zu sein, die durch PWM auslösbare Proliferation in humanen tonsillären B-Zellen zu unterdrücken. Im MTT-Test waren die Werte für TUR mit gleichzeitiger PWM-Inkubation nicht von denen der Kontrollzellen zu unterscheiden (Abb. 21 B), was bedeutet, daß es nicht zu einer Verringerung der Stoffwechselleistung der Zellen kam, so daß dies nicht als Grund für die verminderte Proliferationsrate angegeben werden kann.

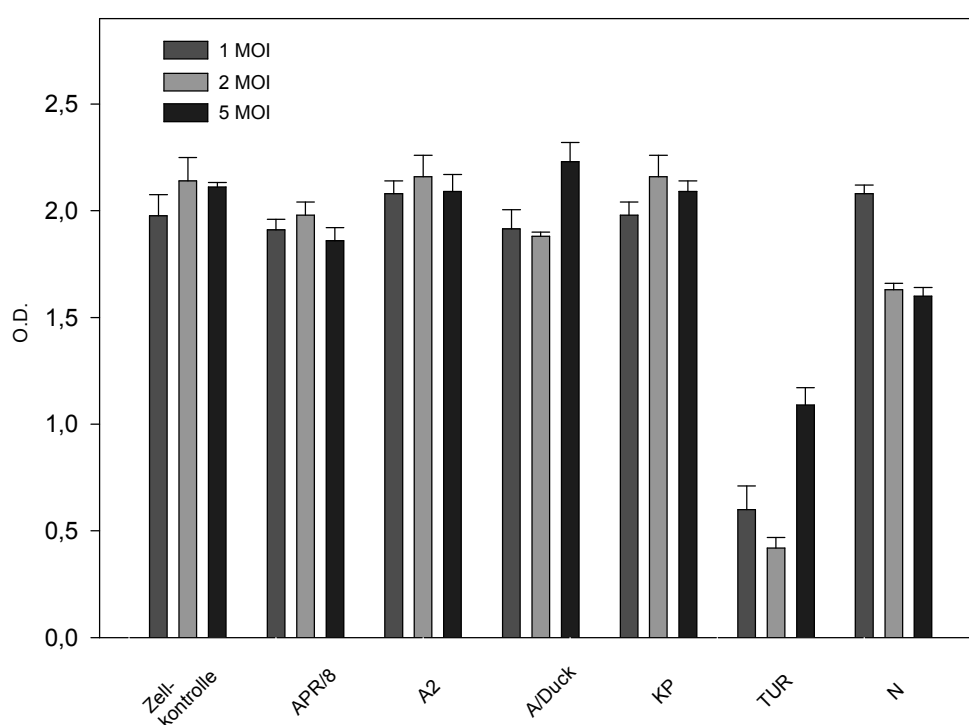


Abb 25: Einfluß aktiver Viren auf die Zellproliferation tonsillärer B-Lymphozyten bei gleichzeitiger Mitogengabe. BrdU wurde 16 h vor Versuchsende dem Medium zugesetzt. Gezeigt werden Ergebnisse nach Infektion mit unterschiedlichen Influenza A-Viren in drei Dosierungen (1,2 oder 5 MOI) unter gleichzeitiger Stimulation mit 10 µg/ml PWM

## 3.5.2.3. Proliferation nach Einsatz UV-inaktivierter Viren

## Ergebnisse

Da es nach O.Rott et al. zur Auslösung der Proliferation in murinen B-Lymphozyten nicht notwendig ist, replizierfähiges Virus zu benutzen, wurden Viren der beiden Influenza A-Stämme APR/8 und A2 UV-inaktiviert, dadurch replizierunfähig gemacht und in den Versuch eingesetzt. Weiterhin wurde wieder PWM eingesetzt. PWM war in der Lage, die Proliferation relativ zur Zellkontrolle um das fünffache zu steigern, ebenso aktives APR/8. Die aktiven A2-Viren steigerten die Proliferation bei diesem Spender um das 18-fache! Die UV-inaktivierten APR/8- und A2-Viren dagegen steigerten die Proliferation auch nur um das fünffache.

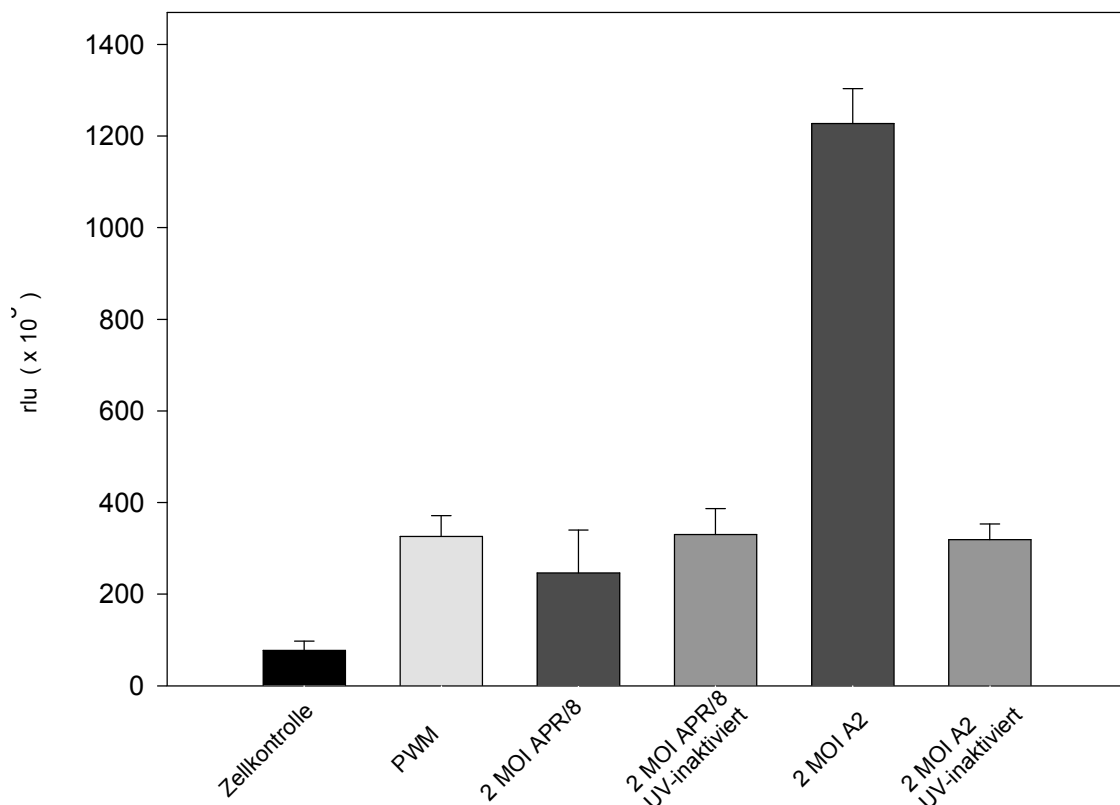


Abb 26: Einfluß inaktivierter Influenza A-Viren auf die Zellproliferation tonsillärer B-Zellen. Die BrdU-Zugabe erfolgte 16 h vor Versuchsende. Verglichen wurden Kontrollzellen mit Zellen, die entweder mit 10 µg/ml PWM, aktivem APR/8 oder A2 oder UV-inaktiviertem APR/8 oder A2 versetzt worden waren.

### 3.5.2.4. Kinetikdarstellung der Proliferation

Wann sind die verschiedenen Stimuli in der Lage, Einfluß auf die Auslösung der Proliferation zu nehmen? Dazu wurde zu unterschiedlichen Zeiten BrdU zu den Zellen gegeben, jeweils 16 h vor Ende des Versuches. Zu sehen ist, daß die Stimulation mit PWM und den Viren einen ähnlichen zeitlichen Verlauf ergab (Abb. 27). Es handelt sich um einen Prozeß, der unabhängig vom Stimulus, wohl eher verzögert in den Zellen eintritt.

## Ergebnisse

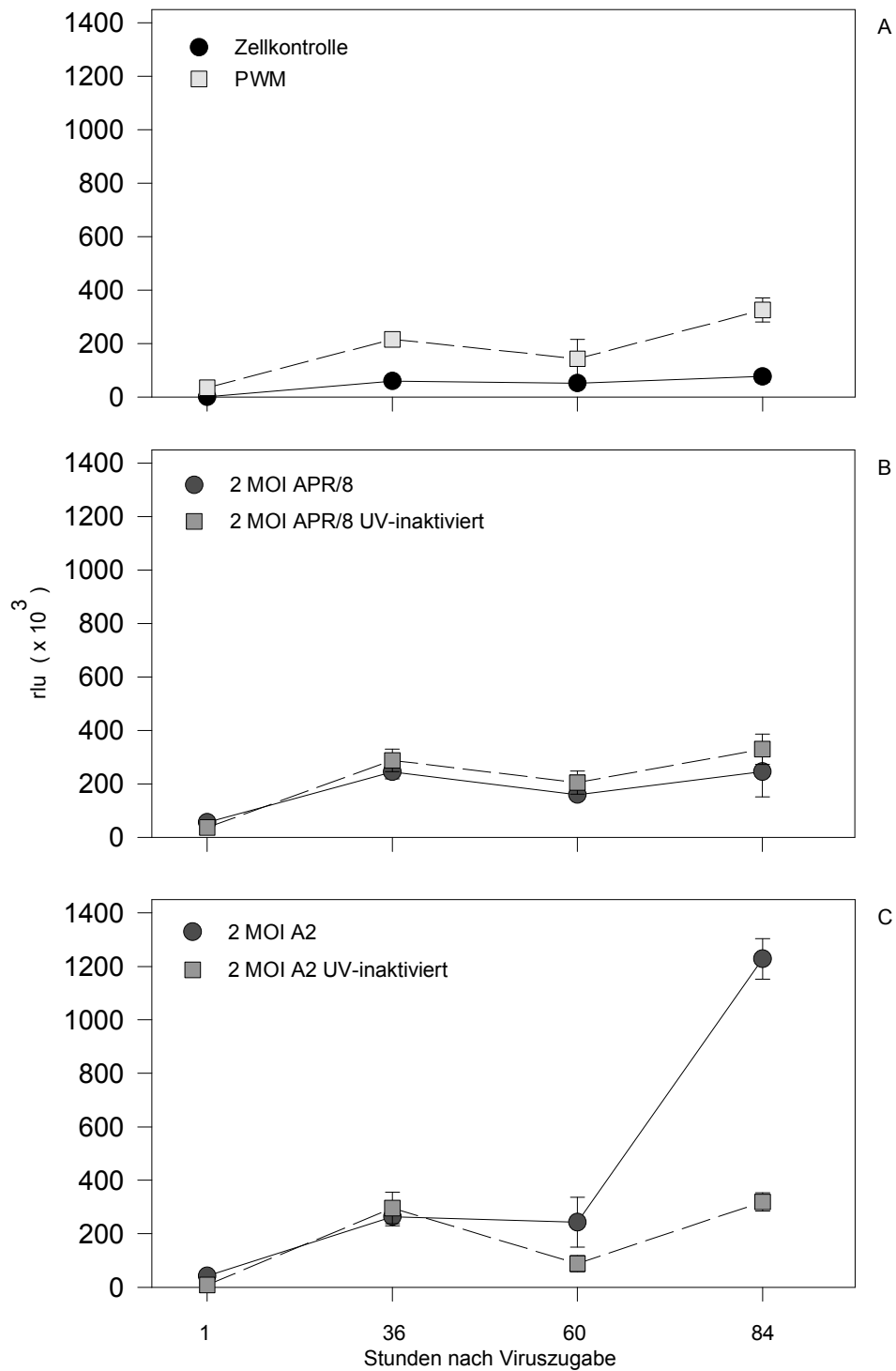


Abb 27: Kinetikdarstellung der Zellproliferation tonsillärer B-Zellen mit Hilfe des Einbaus von BrdU über einen längeren Zeitraum. Die Zugabe des BrdU erfolgte jeweils 16 h vor Versuchsaufbau ins Medium. A: gezeigt werden die Werte für die Zellkontrolle und die mit 10  $\mu\text{g/ml}$  PWM stimulierten Zellen. B: eingesetzt wurden 2 MOI APR/8 in aktivem und UV-inaktivem Zustand. C: dargestellt sind die Ergebnisse nach Infektion mit 2 MOI A2 in aktivem und UV-inaktivem Zustand.



### 3.6. Zytokinproduktion

Da B-Lymphozyten dafür bekannt sind, daß sie die unterschiedlichsten Zytokine produzieren können, die sowohl autokrine, also auf die B-Zellen selbst, als auch parakrine, d. h. auf die Umgebung Einfluß nehmende Wirkung haben, wurden hier unterschiedliche Zytokine in den Zellkulturüberständen untersucht. Da verschiedene Stimuli zu unterschiedlichen B-Zell-Reaktionen führen, könnte das Zytokinprofil eine mögliche Erklärung für einige der hier gezeigten Ergebnisse liefern.

#### 3.6.1. IL-4-Produktion

Im humanen System gilt IL-4 nicht als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für B-Zellen, jedoch ist es in der Lage, die CD23-Expression auf B-Zellen zu induzieren.

IL-4 konnte bei keinem der untersuchten Spender im Überstand nachgewiesen werden.

#### 3.6.2. IL-5-Produktion

IL-5 kann synergistisch mit anderen Zytokinen, wie IL-2 oder IL-4, das B-Zell-Wachstum und die -Differenzierung anstoßen, sowie Einfluß auf die Immunglobulin-Synthese nehmen.

IL-5 wurde mittels eines käuflich erworbenen ELISA-Kits (R&D Systems) im Zellkulturüberstand nachgewiesen.

Nur nach Stimulation mit PWM konnte IL-5 in geringer Menge (50 pg/ml) nach 96h nachgewiesen werden (vgl. Abb. 28). Die virusinfizierten Zellen und die mit inaktiviertem Virus inkubierten Zellen verhielten sich wie die Zellkontrolle, sie produzierten keine meßbaren Mengen an IL-5.

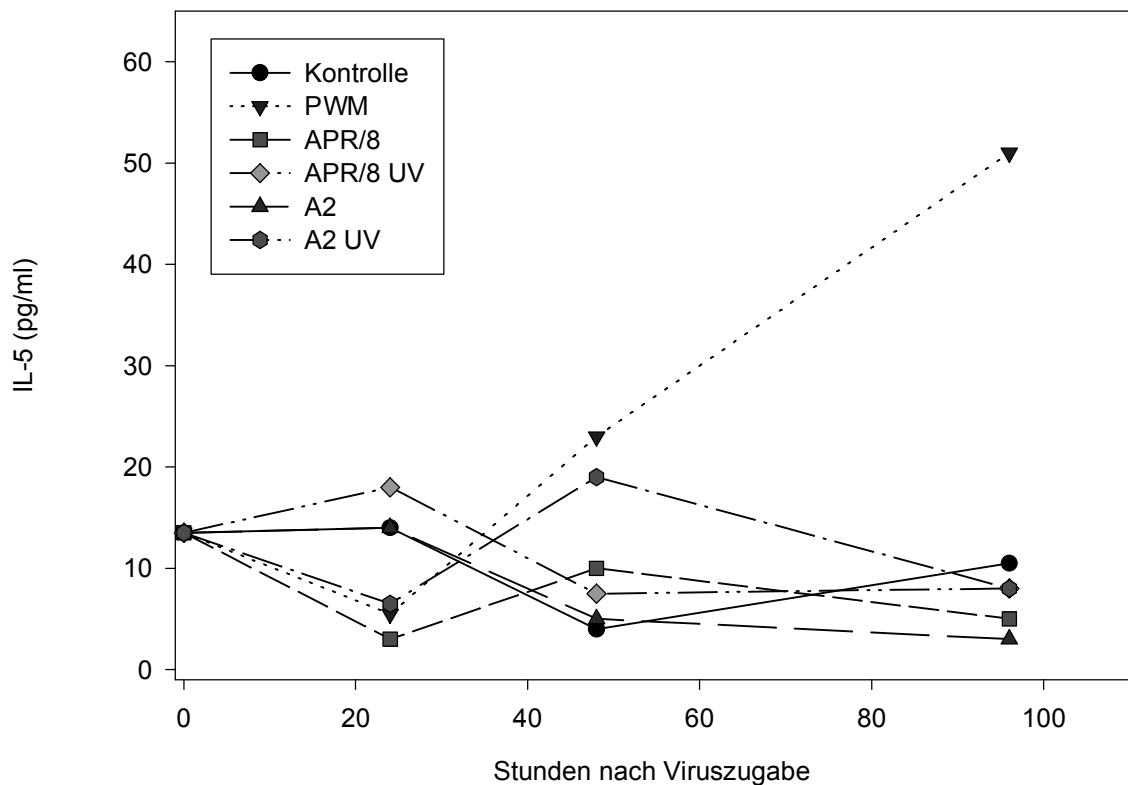


Abb 28: Kinetik der IL-5-Produktion tonsillärer B-Zellen. Im Vergleich zur Kontrolle sind die Werte für die PWM-Stimulation und die nach Influenza-Virus-Infektion gezeigt.

### 3.6.3. IL-6-Produktion

IL-6 ist dasjenige Zytokin, das als der Wachstumsfaktor für aktivierte B-Zellen in der späten Phase der Differenzierung angesehen wird. Die B-Zellen, vor allem die reiferen Zellen, stellen also die Hauptzielzellen für dieses Zytokin dar. Transgene Mäuse, die das IL-6-Gen überexprimieren, entwickeln eine massive polyklonale Proliferation der Plasmazellen.

Periphere B-Lymphozyten produzierten geringe Mengen, nur 75 pg/ml, an IL-6 nach Infektion mit aktivem APR/8, das nach 24h im Zellkulturüberstand zu finden war. Unstimulierte Zellen setzten kein IL-6 frei.

## Ergebnisse

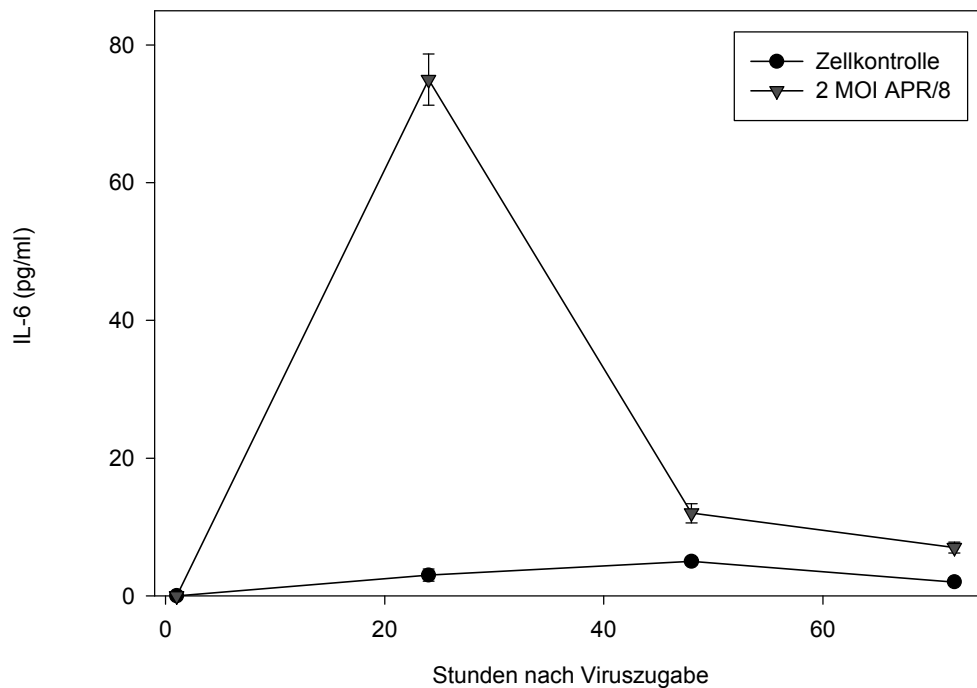


Abb 29: Kinetikdarstellung der IL-6-Freisetzung aus peripheren B-Lymphozyten. Vergleichend wurden die Werte für die Zellkontrolle und die der Zellen, die mit 2 MOI APR/8 infiziert worden waren, aufgetragen.

Tonsilläre B-Lymphozyten wurden mit PWM stimuliert und sowohl mit APR/8 als auch mit A2 infiziert. Die aktiven Viren waren in der Lage, die Zellen zu einer zehnmal höheren IL-6-Produktion als unstimulierte Kontrollzellen zu veranlassen. UV-inaktiviertem A2-Virus gelang dies nur zu einem Bruchteil (ca. dreimal höher als in den Kontrollzellen), ebenso wie PWM, wo fünffach höhere Werte erreicht wurden. Die Kontrollzellen setzten nur bis zu 200 pg/ml IL-6 frei (Abb. 30).

## Ergebnisse

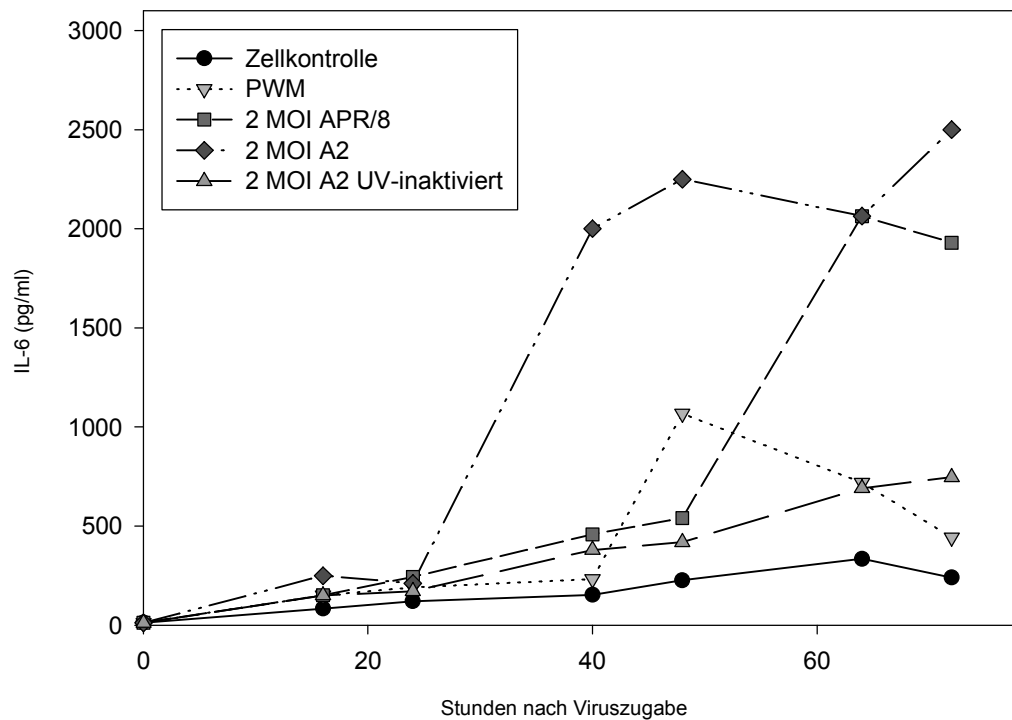


Abb 30: Freisetzung des Zytokins IL-6 aus tonsillären B-Zellen nach Stimulation mit 10 µg/ml PWM oder Infektion mit 2 MOI APR/8 oder A2.

### 3.6.4. TNF-β-Produktion

Lymphotoxin (TNF-β) wurde zuerst in mitogen- oder antigenstimulierten T-Zellen nachgewiesen. Es ist stark homolog zum Tumor-Nekrose-Faktor und zeigt auch ähnliche biologische Aktivitäten. Da Lymphotoxin unter anderem B- und T-Zell-Proliferation auslösen und von tonsillären B-Zellen produziert werden kann, wurde hier untersucht, ob die beobachtete B-Zellproliferation nach Virusinfektion, vor allem nach Infektion mit A2 (vgl 3.5.), eventuell auf eine autokrine Lymphotoxinstimulation zurückzuführen ist.

Im Zellkulturüberstand tonsillärer B-Zellen wurde TNF-β nach Mitogenstimulation mit PWM und nach Virusinfektion mit 2 MOI APR/8 oder A2 untersucht.

## Ergebnisse

Nur PWM war in der Lage, die B-Lymphozyten zur Ausschüttung von Lymphotoxin zu veranlassen (Abb. 31 A), die Influenza A-Viren und die unstimulierten Zellen nicht (Abb.31 B).

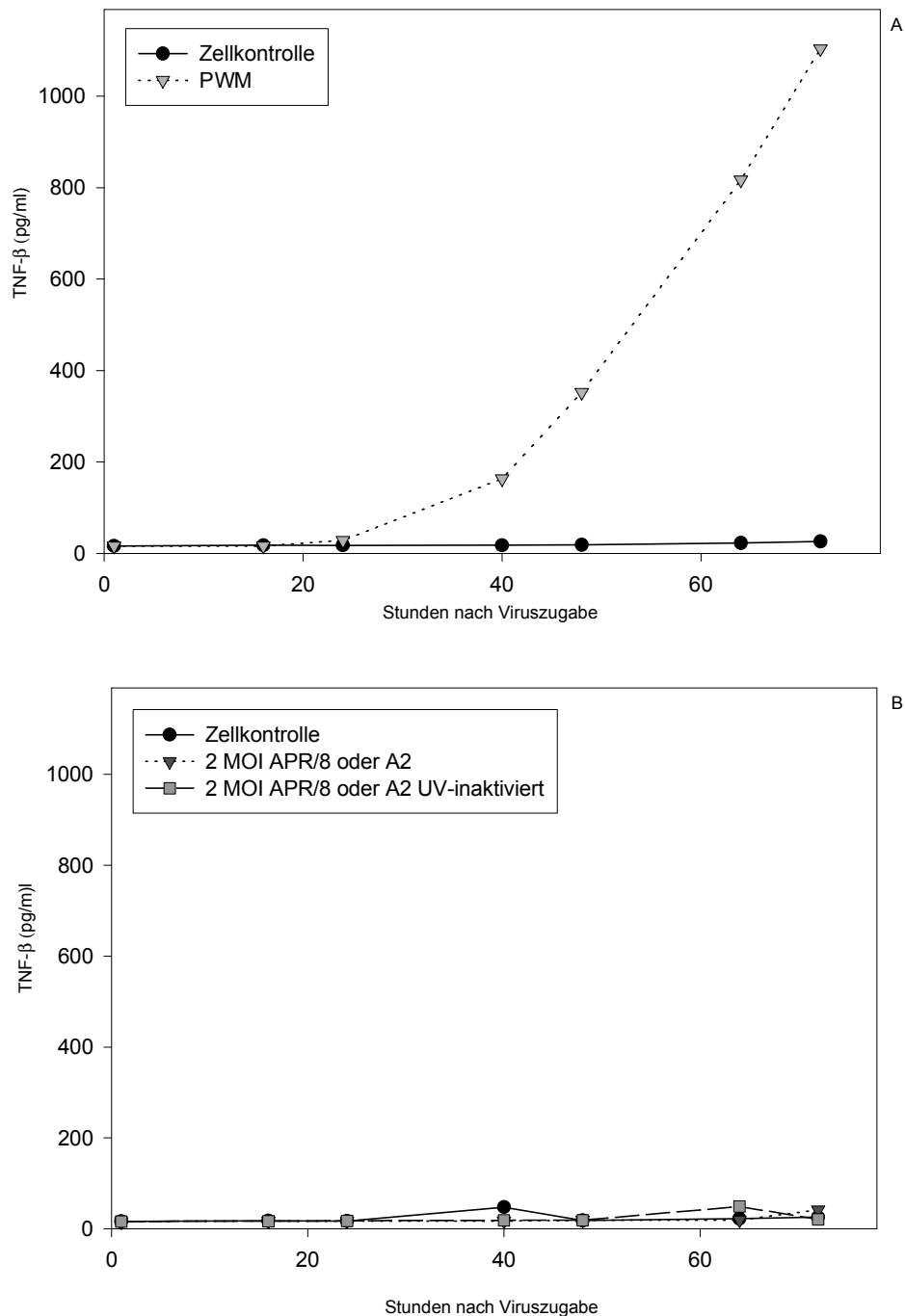


Abb 31: Freisetzung von TNF-β aus tonsillären B-Lymphozyten nach Stimulation mit 10 µg/ml PWM (Bild A) oder Infektion mit 2 MOI APR/8 oder A2 (Bild B).

### 3.6.5. Interferon- $\gamma$

IFN- $\gamma$  ist ein Zytokin, das vorwiegend nichtspezifische Immunzellen aktiviert und zwar während ihrer Effektorphase der zellvermittelten Immunantwort. IFN- $\gamma$  kann außer von antigen-aktivierten T- und NK-Zellen auch von B-Lymphozyten produziert werden. Weiterhin ist IFN- $\gamma$  in der Lage, die CD23-Expression auf B-Lymphozyten herunterzuregulieren, was hier beobachtet wurde (vgl. 3.9.), so daß dieses Zytokin im Hinblick auf einen möglichen Erklärungsansatz untersucht worden war.

Im Zellkulturüberstand tonsillärer B-Lymphozyten wurde nach Stimulation mit PWM und nach Infektion mit 2 MOI APR/8 bzw. A2 nach IFN- $\gamma$  gesucht. PWM, als Mitogen, führte schon nach 48 h zu einer massiven Freisetzung von IFN- $\gamma$ , nach 96 h wurde ein Wert von 2000 pg/ml erreicht (Abb. 32 A). Die aktiven Viren waren dazu nur geringgradig in der Lage (ca 100 pg/ml), während die UV-inaktivierten Viren schon nach 48 h zwischen 400-500 pg/ml IFN- $\gamma$  induzierten. Unstimulierte B-Zellen setzten kein IFN- $\gamma$  frei (Abb. 32 B).

## Ergebnisse

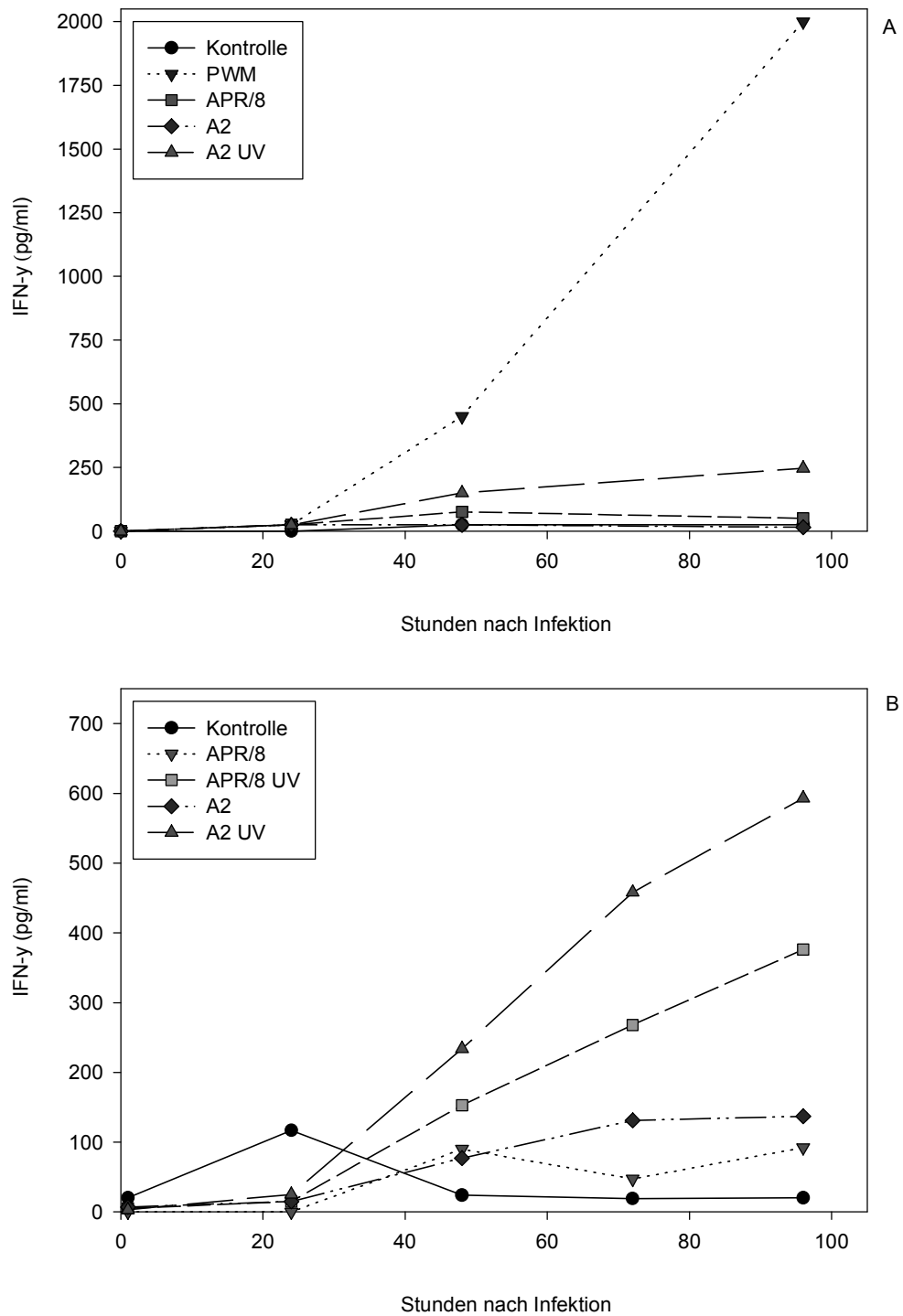


Abb 32: Freisetzung von IFN- $\gamma$  aus tonsillären B-Lymphozyten nach PWM-Stimulation und Virusinfektion mit 2 MOI APR/8 oder A2. Gezeigt sind zwei verschiedene Spender (Bild A und B).

### 3.7. Antiviral wirksame Substanzen

### 3.7.1. Interferon

Hier sind die Typ-I-Interferone gemeint, zu denen IFN- $\alpha$  und - $\beta$  gehören. Sie werden vorwiegend von mononukleären Zellen und Fibroblasten produziert, jedoch auch von peripheren und tonsillären B-Lymphozyten. Sie versetzen die Zellen in einen antiviralen Zustand, der noch nicht infizierte Zellen vor Virusinfektion schützt, indem die Zellen mit speziellen Enzymen ausgestattet werden, welche sogar eine gleichzeitige Proliferation der Zellen verhindern.

#### 3.7.1.1. Interferon-Nachweis auf mRNA-Ebene

IFN-mRNA ist konstitutiv in humanen B-Lymphozyten vorhanden. Um zu zeigen, daß sie nur im Falle einer Virusinfektion in Proteine umgeschrieben wird und diese aus der Zelle ausgeschleust werden, wurde mit Hilfe der RT-PCR und im Northern Blot am Beispiel des IFN- $\alpha$ 2 die mRNA in Kontrollzellen, in virusinfizierten Zellen und in von mit dem IFN-Stimulus schlechthin, Poly(I:C), stimulierten Zellen dargestellt.

##### 3.7.1.1.1. Nachweis über PCR

Mit Hilfe eines für IFN- $\alpha$ 2 spezifischen Primerpaares, das ein 322 bp-Fragment, und Primern, die ein 800 bp- und 500 bp-Fragment zweier Virusproteine einschließen, wurde gezeigt (Abb 33), daß, gleichgültig, ob es sich um unstimulierte Kontrollzellen, um virusinfizierte Zellen oder um mit Poly(I:C) stimulierte Zellen handelt, zu den verschiedenen Zeitpunkten 0,5 h, 3 h und 26 h gleichviel mRNA für IFN- $\alpha$ 2 in den Zellen vorhanden war. Schon 0,5 h nach Virusinfektion war von den Zellen umgeschriebene mRNA für die Virusproteine von APR/8 im Zytoplasma vorhanden!



## Ergebnisse

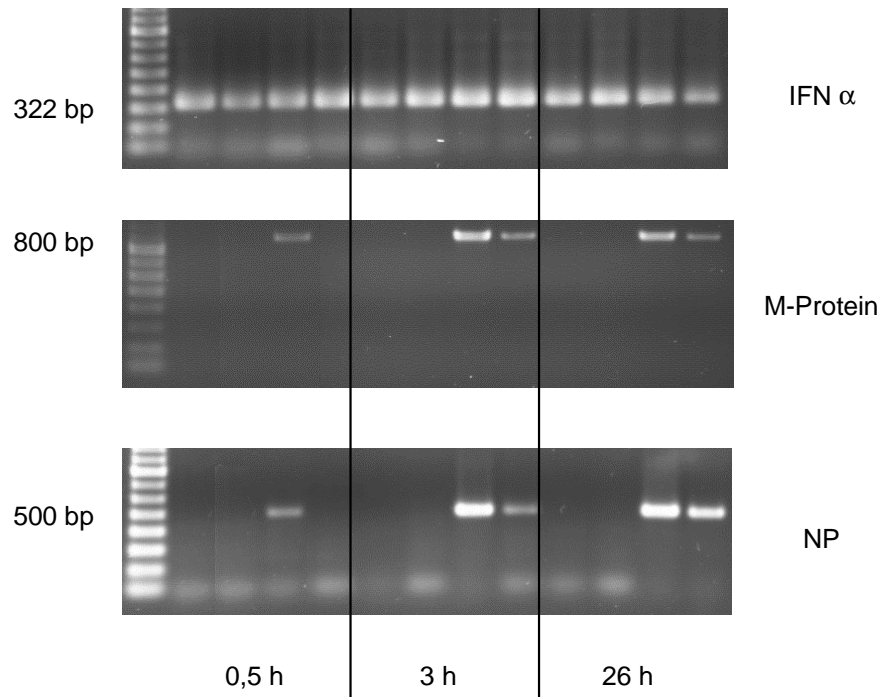


Abb 33: Interferon-mRNA-Nachweis mittels RT-PCR-Technik. Dargestellt ist die mRNA zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (0,5 h, 3 h und 26 h) der Zellkontrolle (Bahn 1), nach Gabe von 20 µg/ml Poly (I:C) (Bahn 2), nach Infektion mit 2 MOI APR/8 (Bahn 3) oder A2 (Bahn 4). Im oberen Bildteil wurde die mRNA für IFN-α, in der Mitte und im untersten Bild die für die Virusproteine M und NP dargestellt.

### 3.7.1.1.2. Nachweis im Northern Blot

Auch hier wurde, wie unter 3.7.1.1.1. schon beschrieben, die mRNA für IFN-α2 dargestellt, jedoch im Vergleich zu einem konstitutiv exprimierten Gen, dem Gen für die GAPDH, was im oberen Blot der Abbildung 34 gezeigt ist. Darunter sind die Banden der mRNA für IFN-α2 abgebildet, die ebenfalls sehr gleichmäßig aussahen, so daß man davon ausgehen kann, daß es sich auch hierbei um ein konstitutiv exprimiertes Gen handelte.

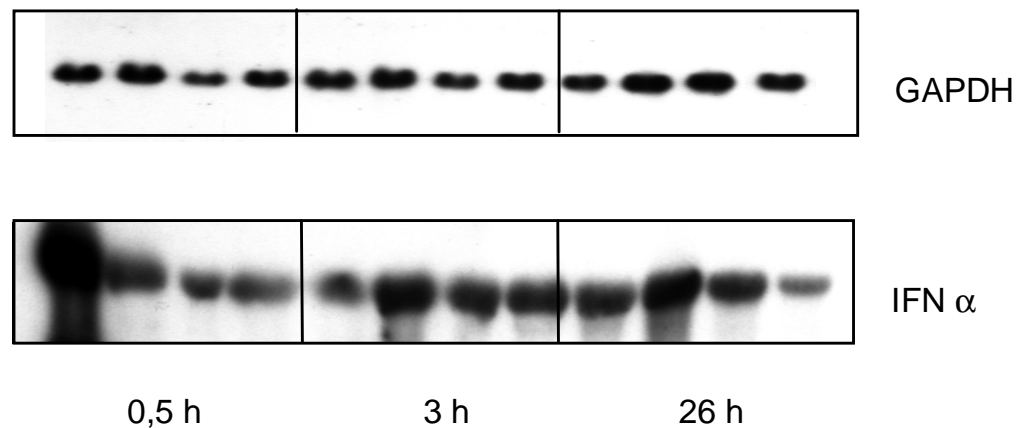


Abb 34: Darstellung der mRNA von IFN- $\alpha$  im Vergleich zur mRNA von GAPDH im Northern Blot. In Bahn 1 ist die mRNA der Zellkontrolle gezeigt, in Bahn 2 die nach 20  $\mu$ g/ml Poly (I:C)-Gabe und in Bahn 3 und 4 die nach Infektion mit 2 MOI APR/8 oder A2. Gewählt wurden die Zeitpunkte 0,5 h, 3 h und 26 h.

### 3.7.1.2. Proteinnachweis

Wie unter 3.7.1.1. gezeigt, scheint es nicht entscheidend zu sein, ob mRNA für IFN- $\alpha/\beta$  vorhanden ist, sondern, ob diese mRNA translatiert und das Protein, um seine parakrine Wirkung ausüben zu können, auch in die Umgebung abgegeben wird. Es existieren zwei Bioassay-Systeme, in denen zum einen ausschließlich IFN- $\alpha$  auf MDBK-Zellen und zum andern ein Gemisch aus IFN- $\alpha$  und - $\beta$  auf HeLa-Zellen nachgewiesen werden kann.

#### 3.7.1.2.1. IFN-Bioassay auf MDBK-Zellen

In Abb. 35 wurde die IFN- $\alpha$ -Produktion peripherer ruhender B-Lymphozyten gezeigt. In den Überständen der Zellkontrolle und der mit Poly(I:C) stimulierten Zellen war kein IFN- $\alpha$  nachzuweisen, jedoch in den Überständen der mit 2 MOI APR/8 infizierten Zellen nach 24 h.

## Ergebnisse

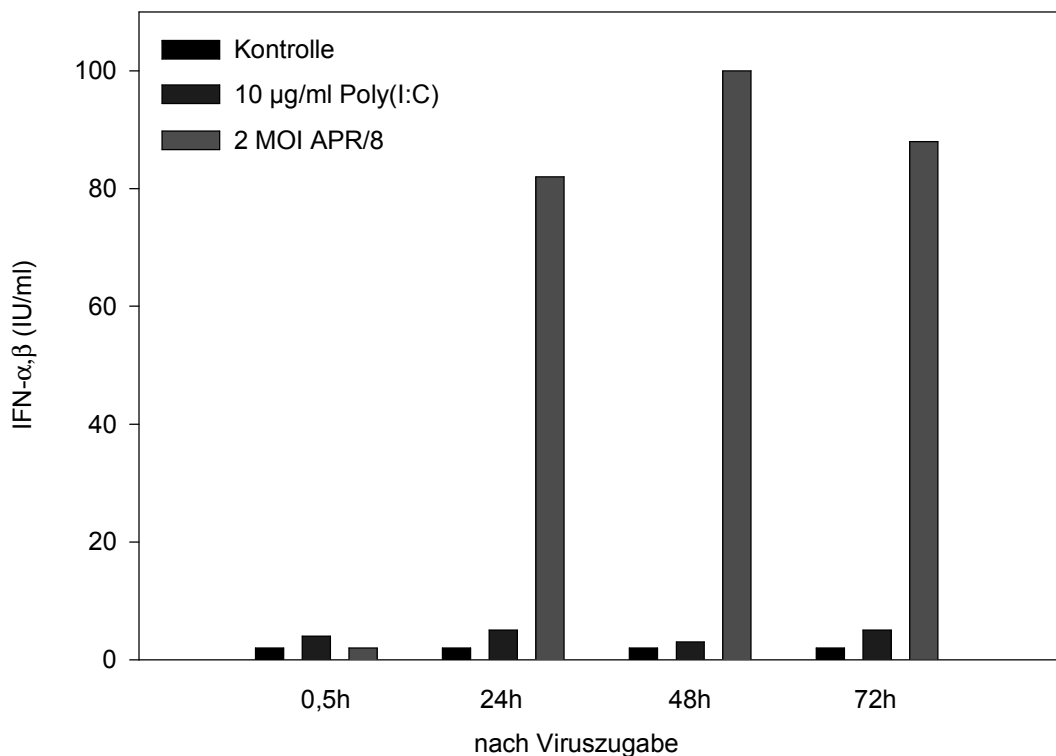


Abb 35: Darstellung der IFN- $\alpha,\beta$ -Produktion peripherer B-Lymphozyten, gemessen im Bioassay auf MDBK-Zellen. Vergleichend abgebildet sind die Werte für die Zellkontrolle, für die Stimulation mit 20 µg/ml Poly(I:C) und für die Infektion mit 2 MOI APR/8.

In Abbildung 36 ist die Freisetzung von IFN- $\alpha$  aus tonsillären B-Lymphozyten gezeigt. Schon nach 0,5 h befand sich IFN-Protein im Überstand nach Infektion mit 2 MOI APR/8, die Werte stiegen sogar noch an. Die Proteinfreisetzung nach Infektion mit 2 MOI A2 fand etwas später statt, jedoch in ähnlichen Mengen wie nach einer APR/8-Infektion. Der klassische IFN- $\alpha/\beta$ -Stimulus scheint bei B-Lymphozyten seinen Dienst zu versagen, denn es kam erst nach 26 h zu einer sehr geringen Proteinfreisetzung. Im Überstand der Kontrollzellen war kein IFN nachzuweisen, was auch nicht zu erwarten war.

## Ergebnisse

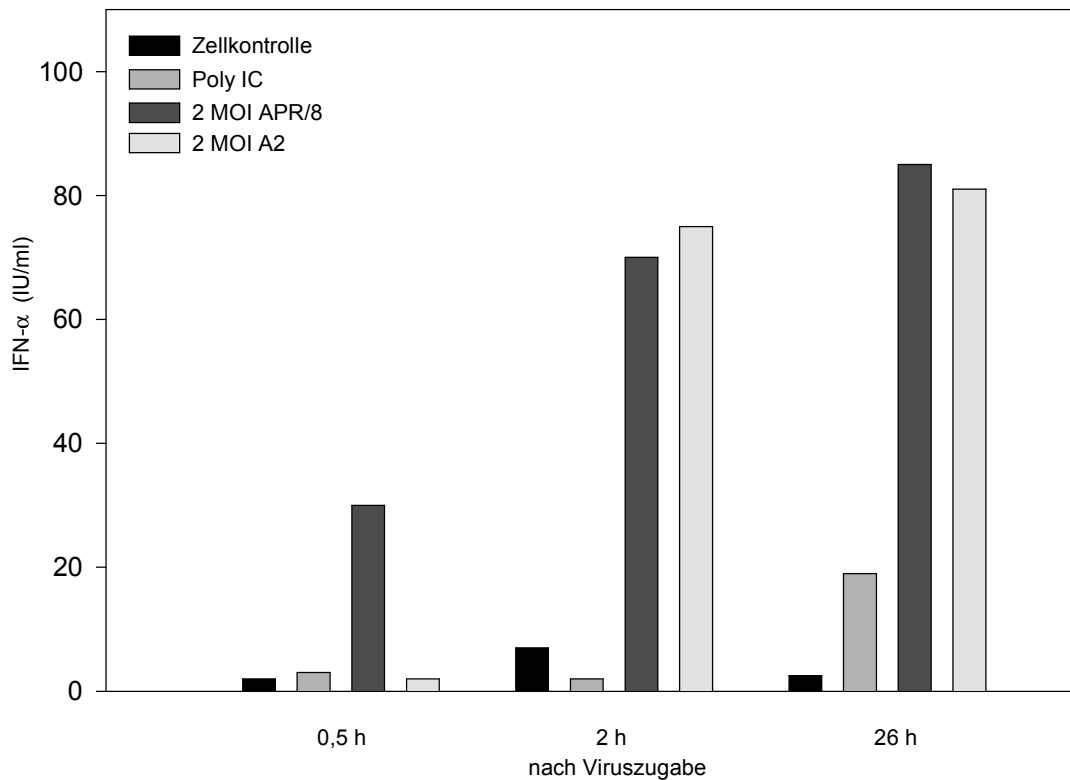


Abb 36: Freisetzung von IFN- $\alpha$  aus tonsillären B-Zellen. Die Zellkulturüberstände der Zellkontrolle, der mit 20  $\mu$ g/ml Poly(I:C) stimulierten oder 2 MOI APR/8 bzw. A2 infizierten Zellen wurden im Bioassay auf MDBK-Zellen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht.

### 3.7.1.2.2. IFN-Bioassay auf HeLa-Zellen

Der Nachweis für IFN- $\alpha/\beta$  aus tonsillären B-Zellen wurde in Abb 37 erbracht: Auch hier kam es nur nach Virusinfektion zu einer Proteinfreisetzung, die Kontrollzellen zeigten keine Reaktion und auch die Poly(I:C)-Stimulation zeigte erst nach 26 h geringe Wirkung.

## Ergebnisse

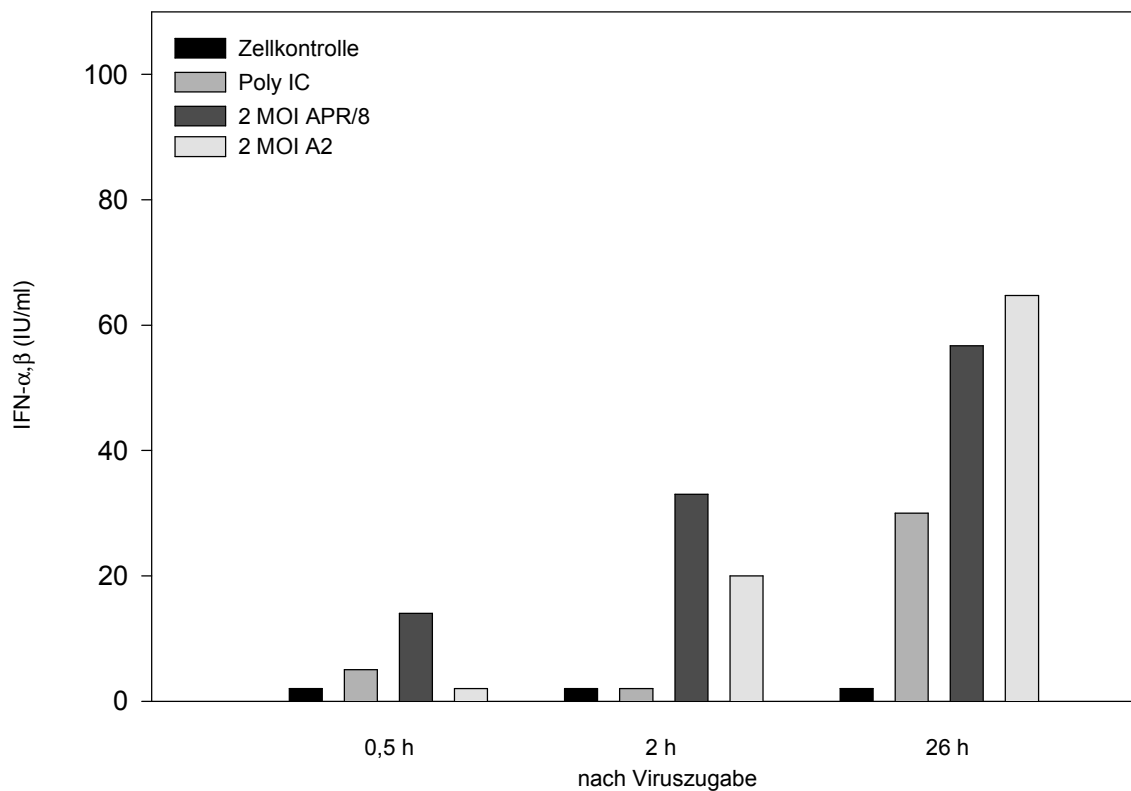


Abb 37: Freisetzung von IFN- $\alpha/\beta$  aus tonsillären B-Zellen. Die Zellkulturüberstände der Zellkontrolle, der mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Poly(I:C) stimulierten oder 2 MOI APR/8 bzw. A2 infizierten Zellen wurden im Bioassay auf HeLa-Zellen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht.

Sind auch inaktivierte Viren in der Lage, die B-Zellen zur Translation der mRNA für IFN- $\alpha/\beta$  zu veranlassen?

Im Versuch wurden jeweils 2 MOI APR/8 bzw. A2 in aktivem und UV- und 56°C-inaktiviertem Zustand mit den B-Zellen inkubiert. Die Ergebnisse der IFN-Proteinfreisetzung sind in Abbildung 38 A und B dargestellt: Sowohl APR/8 (Abb. 38 A) als auch A2 (Abb 38 B) sind in aktivem wie auch in inaktivem Zustand in der Lage, die Zellen zur Proteinfreisetzung zu veranlassen, wobei die Reaktion auf die APR/8-Infektion schneller war, als die auf die A2-Infektion.

## Ergebnisse

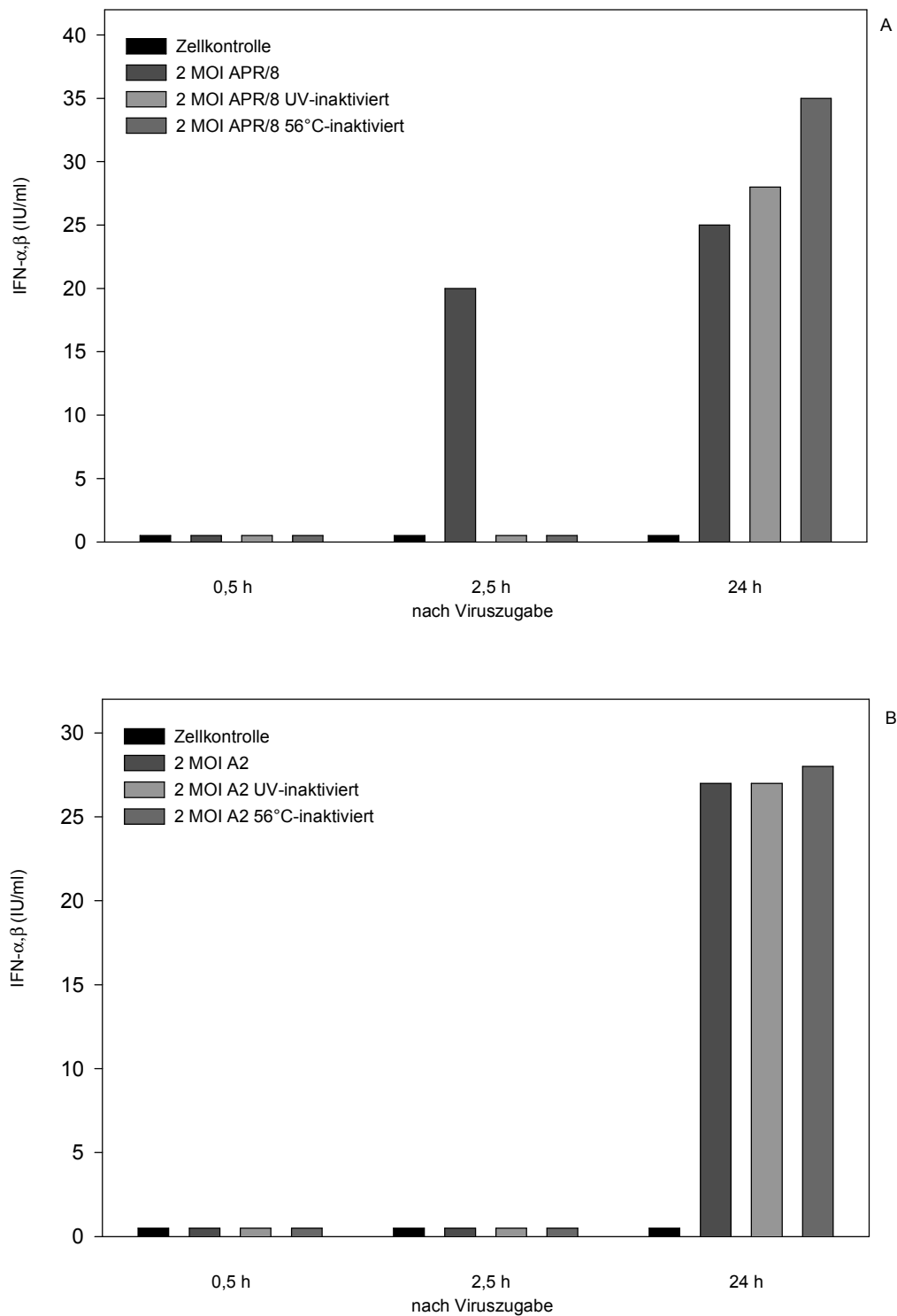


Abb 38 : Freisetzung von IFN- $\alpha/\beta$  aus tonsillären B-Lymphozyten nach Zugabe von A: 2 MOI APR/8 in aktivem, UV-inaktiviertem und 56°C-inaktiviertem Zustand B: 2 MOI A2 in aktivem, UV-inaktiviertem und 56°C-inaktiviertem Zustand. Ermittelt wurden die Werte dreier Zeitpunkte im Bioassay auf HeLa-Zellen.

### 3.8. Chemokinproduktion

#### 3.8.1. Interleukin 8

Es ist bekannt, daß normale B-Zellen und einige humane B-Zelllinien IL-8, ein Chemokin, das Neutrophile anlockt, konstitutiv produzieren können. Eine für Viren wichtige Strategie Immunantworten auszuschalten ist, die Produktion immunmodulatorischer Stoffe zu unterdrücken, um ihre Vermehrung nicht zu gefährden. Hier wurde untersucht, ob die Viren diese Strategie auch in B-Lymphozyten entwickeln konnten.

In den Überständen tonsillärer B-Lymphozyten wurde nach PWM-Stimulation, nach APR/8- bzw. A2-Infektion nach IL-8 gesucht.

Daß auch in diesen Zellen die IL-8-Produktion konstitutiv erfolgte, ist an der Zellkontrolle zu sehen (Abb. 39 A), da im Verlauf von drei Tagen die IL-8-Menge im Überstand kontinuierlich anstieg, ohne daß die Zellen einem Stimulus ausgesetzt waren. PWM war erst nach 72 h in der Lage, dieser Produktion Einhalt zu gebieten (Abb. 39 A), im Gegensatz dazu jedoch sank die Freisetzung von IL-8 nach Infektion mit aktivem APR/8 und A2 schon nach 24 h (Abb. 39 B und C). Wurden die Viren in UV-inaktivierter Form zugesetzt, waren also nicht mehr replizierfähig, trat dieses Phänomen in nicht so starker Form erst nach 72 h ein (Abb. 39 B und C). APR/8 schien in der Lage zu sein, die Produktion stärker und früher zu unterdrücken als A2, was vielleicht damit zusammenhängt, daß es einen schnelleren Replikationszyklus hat als A2 (vgl. Abb. 32 Mitte und unten, Darstellung des M- und N-Proteins).

## Ergebnisse

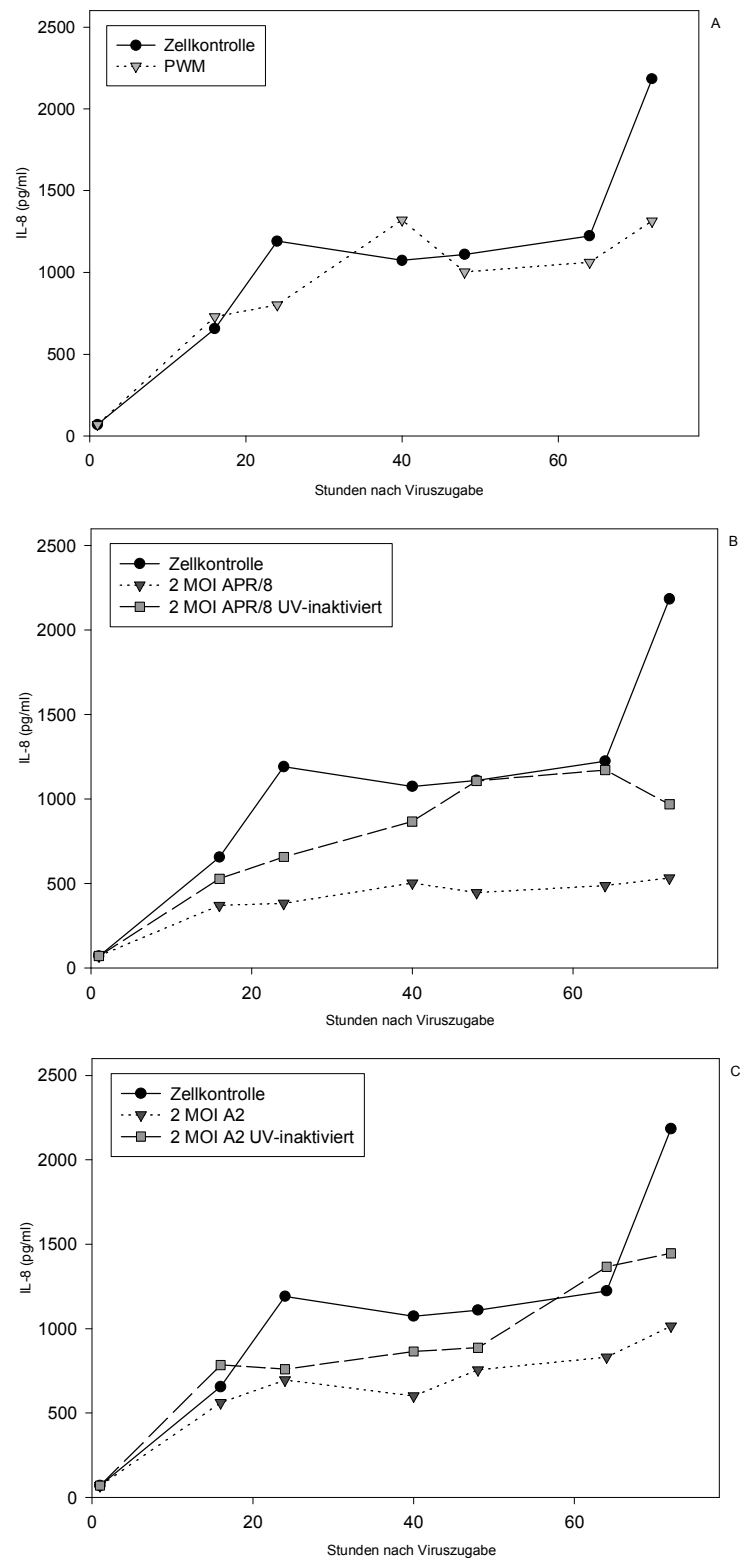


Abb 39: IL-8-Freisetzung aus tonsillären B-Lymphozyten nach A: 10 µg/ml PWM-Stimulation, nach B: Zugabe von 2 MOI APR/8 und C: nach Zugabe von 2 MOI A2, jeweils im Vergleich zur Zellkontrolle abgebildet.



### 3.8.2. MCP-1

MCP-1 wirkt chemotaktisch auf Monozyten und Basophile, so daß auch seine Unterdrückung durch Viren für deren Überleben und Vermehrung von Vorteil wäre. Humanes MCP-1 wird von einigen Tumorzellen konstitutiv exprimiert, und beinahe alle normalen Zellen und Gewebe können MCP-1 nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen exprimieren (Yoshimura et al. 1989, Colotta et al., 1994). Aus diesem Grunde wurden die Überstände der tonsillären B-Zellen auch auf MCP-1 untersucht.

Im Gegensatz zur bestehenden Meinung, daß nur stimulierte Zellen dieses Chemokin freisetzen können, stiegen hier die Werte für MCP-1 in den Überständen der Zellkontrolle kontinuierlich an (Abb. 40 A). In den mit dem Mitogen PWM (Abb. 40 A) stimulierten und mit aktivem A2 infizierten (Abb. 40 C) B-Zellen wurde die Freisetzung dagegen reduziert und nach Virusinfektion mit aktivem APR/8 (Abb. 40 B) sogar vollständig unterdrückt. Dieses Phänomen der Unterdrückung nach Virusinfektion konnte durch den Einsatz UV-inaktivierter Viren komplett aufgehoben werden (Abb.40 B und C).

## Ergebnisse

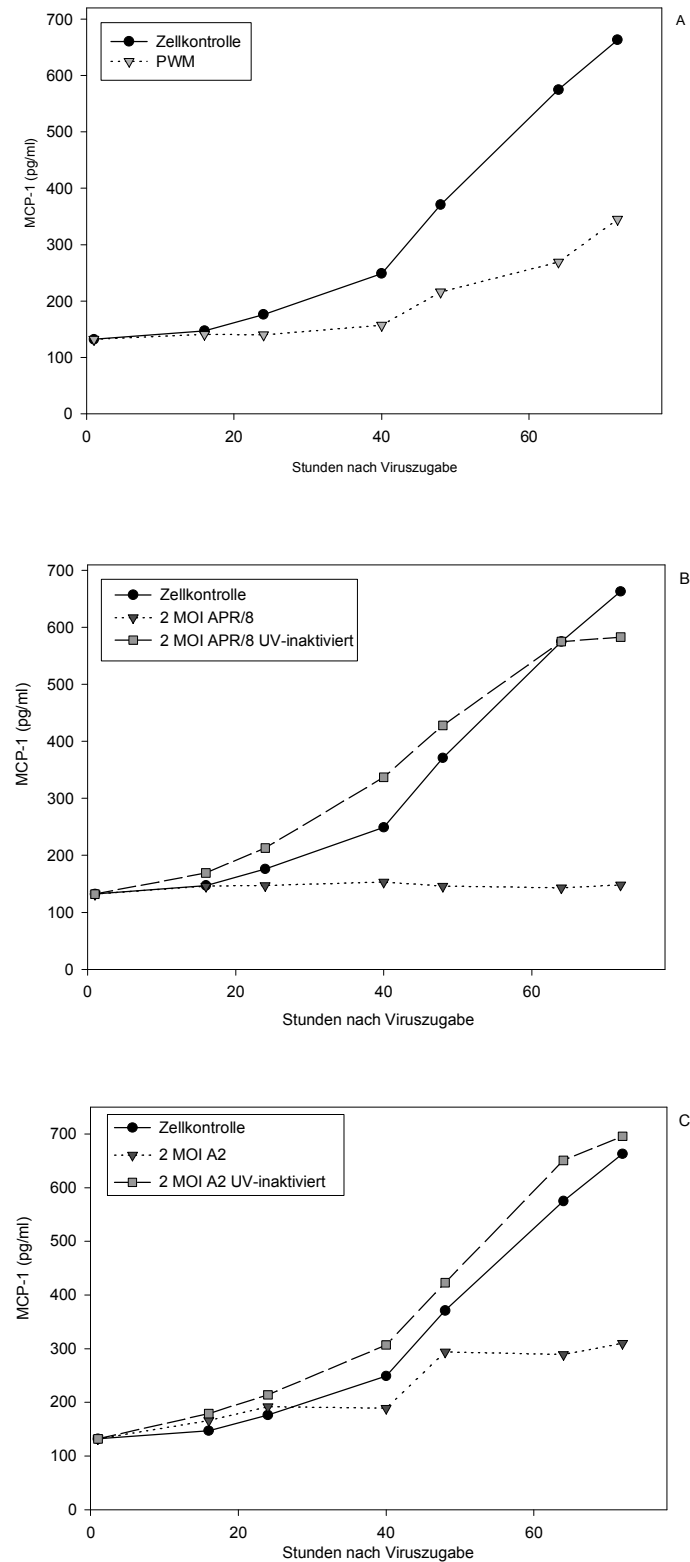


Abb 40: MCP-1-Freisetzung aus tonsillären B-Lymphozyten nach A: 10 µg/ml PWM-Stimulation, nach B: Zugabe von 2 MOI APR/8 und C: nach Zugabe von 2 MOI A2, jeweils im Vergleich zur Zellkontrolle abgebildet.

### 3.8.3. MIP-1 $\alpha$ und MIP-1 $\beta$

Hierbei handelt es sich um zwei Chemokine, die offenbar ausschließlich von aktivierten T- und B-Lymphozyten und Makrophagen produziert werden (Wolpe und Cerami, 1988; Lukacs et al., 1994), nicht jedoch in unstimulierten Zellen.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigten, daß unstimulierte Zellen nur sehr wenig MIP-1 $\alpha$  oder - $\beta$  freisetzen, nämlich nur ca. 200 pg/ml (Abb. 41 und 42). Im Gegensatz dazu waren sowohl PWM (Abb 41 und 42 A) als auch Influenza-Viren, ob in aktivem oder in inaktiviertem Zustand, in der Lage, die Produktion zu erhöhen. Aktives A2 Virus erhöhte die Freisetzung um ein zehnfaches, UV-inaktivierte Viren und APR/8 um ungefähr das Fünffache (Abb. 41 B, C und 42 B, C).

## Ergebnisse

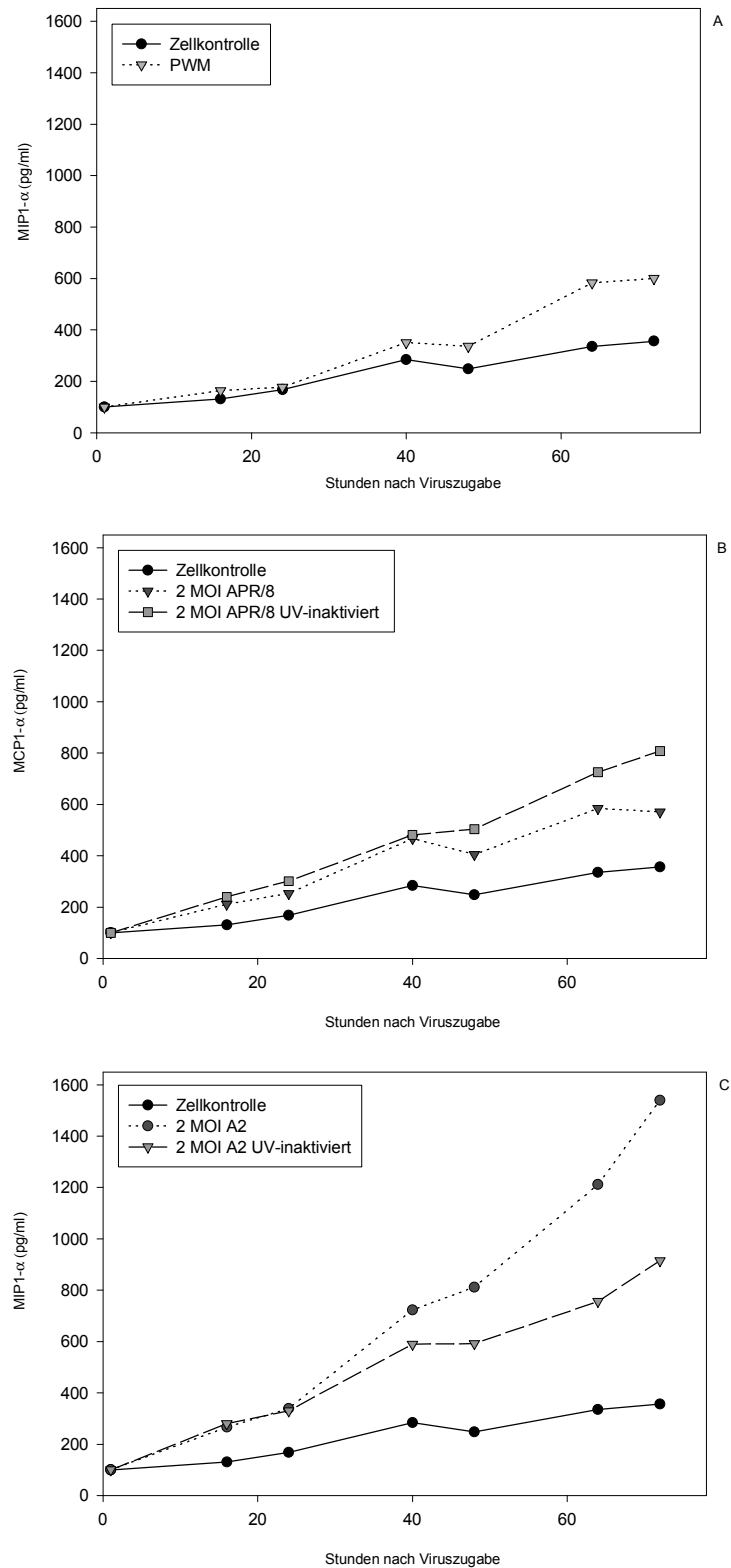


Abb 41: MIP-1 $\alpha$ -Freisetzung tonsillärer B-Lymphozyten nach A: 10  $\mu$ g/ml PWM-Stimulation, nach B: Zugabe von 2 MOI APR/8 und C: nach Zugabe von 2 MOI A2, jeweils im Vergleich zur Zellkontrolle abgebildet.

## Ergebnisse

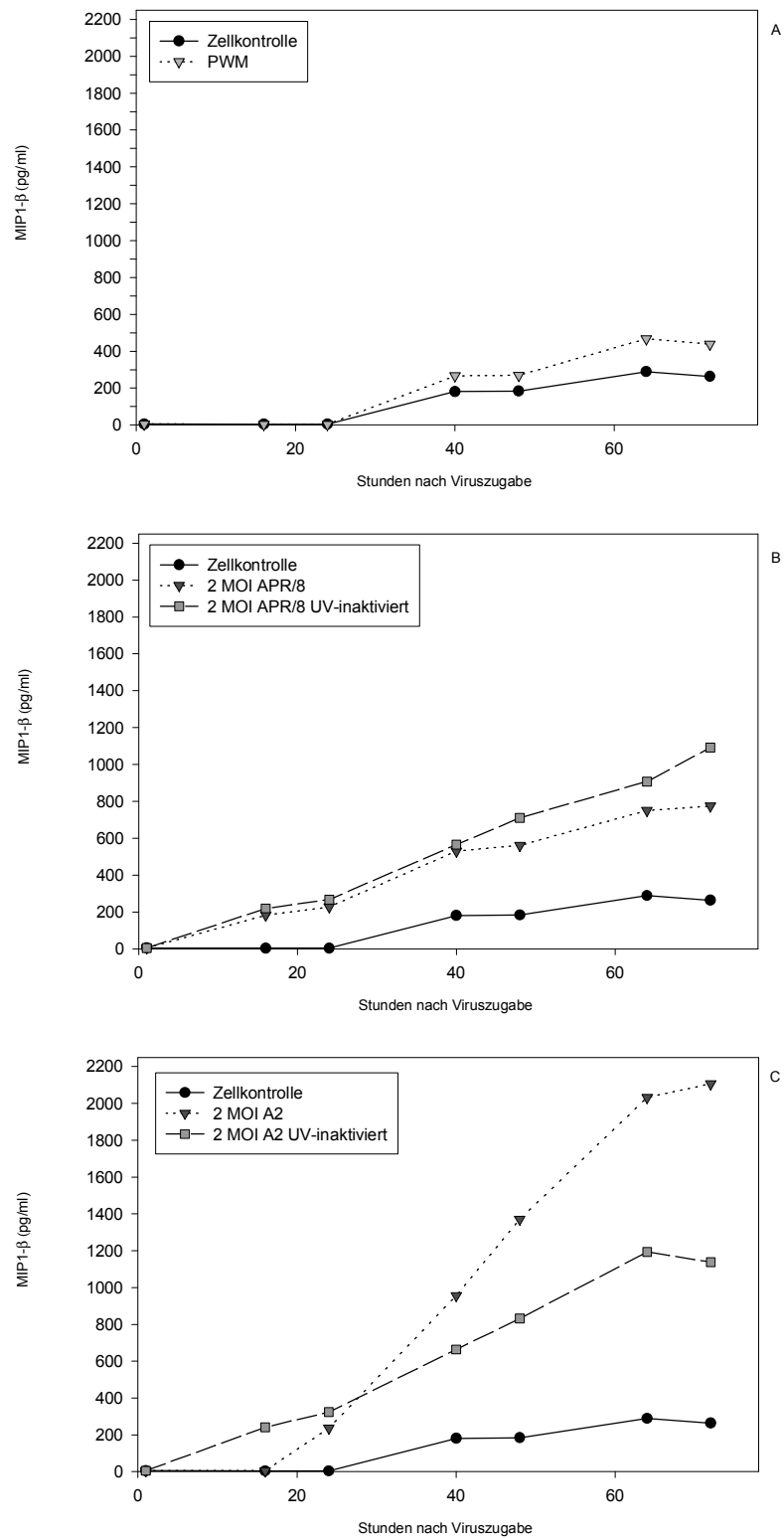


Abb 42: MIP-1 $\beta$ -Freisetzung tonsillärer B-Lymphozyten nach A: 10  $\mu$ g/ml PWM-Stimulation, nach B: Zugabe von 2 MOI APR/8 und C: nach Zugabe von 2 MOI A2, jeweils im Vergleich zur Zellkontrolle abgebildet.

### 3.9. CD23-Expression

Das CD23-Molekül ist mit dem niedrig affinen IgE-Rezeptor ( $F_{\epsilon}R II$ ) identisch (Bonney et al., 1987) und kann bei aktivierten B-Zellen durch Proteolyse als lösliches Fragment mit pleiotroper Zytokinwirkung freigesetzt werden (Cairns et al., 1990). IL-4, ebenso wie ein Gemisch aus IL-4 und Anti- $\mu$ , sind in der Lage, die Expression auf B-Lymphozyten zu induzieren, IFN- $\gamma$  hat hemmende Wirkung.

In Abbildung 43 wird mit Hilfe der FACS-Methode gezeigt, daß APR/8 in der Lage ist, die konstitutive CD23-Expression von IM-9-Zellen schon nach 2h p.i. drastisch zu reduzieren und die langsam wieder ansteigende Expression, die vermutlich durch die fortwährenden Zellteilungen der Zell-Linie auftritt, dauerhaft niedrig zu halten. A2 ist dazu nicht in der Lage, die Zellen verhielten sich wie die Kontrollzellen.

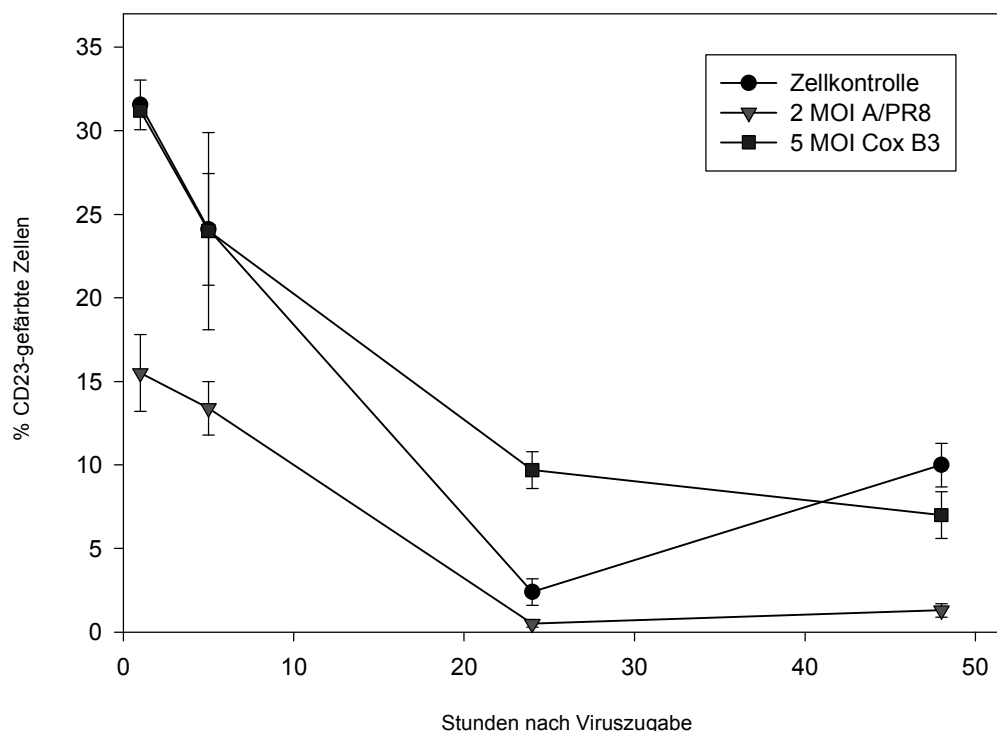


Abb 43: Oberflächenexpression von CD23 auf IM-9-Zellen mit Hilfe der FACS-Methode. Vergleichend abgebildet wurden Werte der Zellkontrolle und Werte nach Infektion mit 2 MOI APR/8 bzw. A2.

In Abbildung 44 ist die CD23-Expression tonsillärer B-Lymphozyten dargestellt. In Bild A sind unstimulierte Zellen ohne Virus und nach Virusinfektion gezeigt; in Bild B ist die Induktion von CD23 nach IL-4-Zugabe ohne und mit Viruseinfluß gezeigt und schließlich in Bild C die Induktion nach IL-4- und Anti- $\mu$ -Stimulation.

Die normale CD23-Expression unstimulierter B-Zellen bewegte sich bei ungefähr 40% gefärbter Zellen. Hier war sowohl APR/8 als auch A2 in der Lage, die CD23-Expression zu unterdrücken (nach APR/8-Infektion am dritten Tag auf 20% gesunken) , wobei A2 sie nahezu vollständig hemmte, es waren nur noch 5% am fünften Tag CD23-positiv (Abb. 44 A).

IL-4 erhöhte die CD23-Expression in den Kontrollzellen auf ca. 65% CD23 gefärbte Zellen, und zwar schon nach einem Tag, wobei A2 diese Induktion etwas bremsen konnte und sich der Anteil an CD23-positiven Zellen bei 40% einpendelte. Erstaunlicherweise schien die Infektion mit APR/8 die Induktion noch zu verstärken; schon nach drei Tagen lagen diese Werte über denen der Zellkontrolle und stiegen noch auf über 70% CD23-gefärbte Zellen an (Abb. 44 B).

Die Stimulation mit dem Gemisch aus IL-4 und Anti- $\mu$  konnte die CD23-Expression auf 80% der Zellen auslösen. Weder die Infektion mit A2 noch mit APR/8 war in der Lage, diese massive Erhöhung in irgendeiner Weise zu unterdrücken (Abb. 44 C).

## Ergebnisse

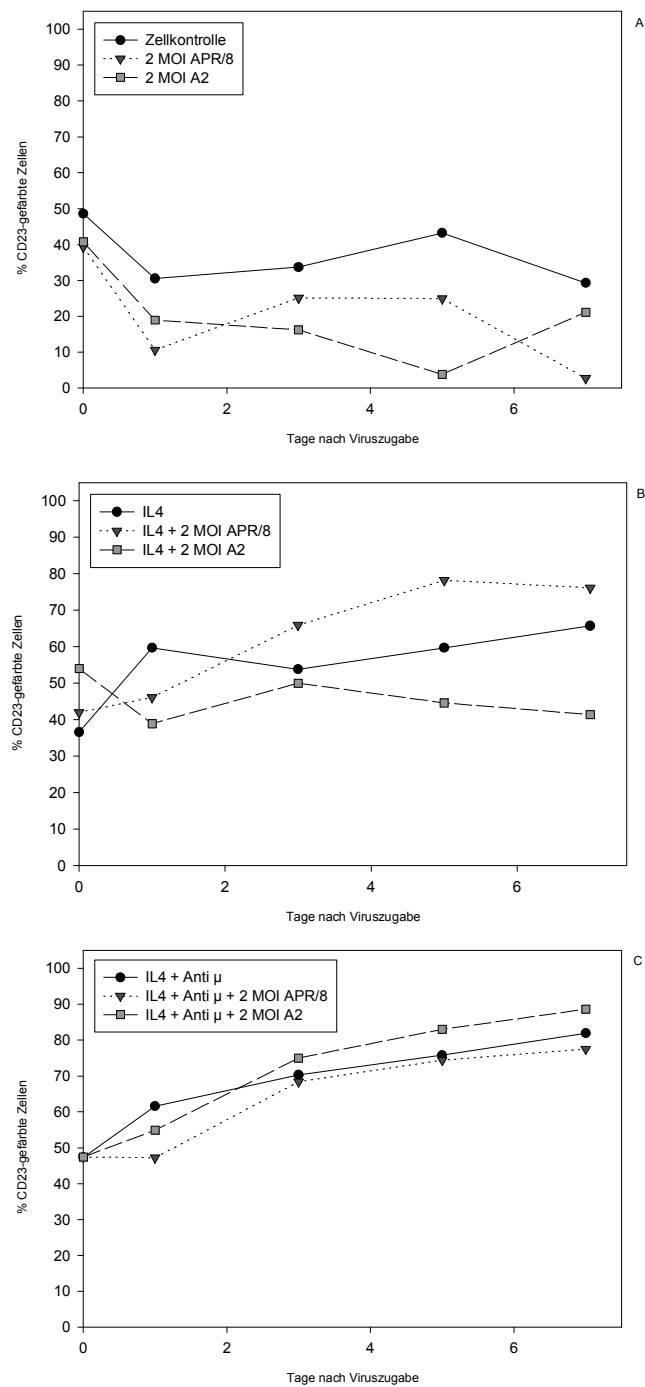


Abb 44: CD23-Oberflächenexpression auf tonsillären B-Zellen, untersucht mit Hilfe der FACS-Methode.

A: Dargestellt ist die Expression der Zellkontrolle im Vergleich zu Zellen, die entweder mit 2 MOI APR/8 oder mit 2 MOI A2 infiziert worden waren.

B: Gezeigt ist die CD23-Expression nach Gabe von 10 ng/ml IL-4, jeweils mit und ohne Zugabe von 2 MOI Virussuspension.

C: Darstellung der CD23-Oberflächenexpression nach gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit 10 ng/ml IL-4 und 10 μg/ml Anti-μ, jeweils ohne und mit Virusexposition.



### 3.10. Weitere Oberflächenmarker

Um nähere Informationen über den Aktivierungszustand der Zelle zu bekommen, vor allem um zu sehen, ob es Unterschiede im Aktivierungszustand der Zellen nach Stimulation mit PWM und der Infektion mit den Influenza A-Viren gibt, wurden auf der Zelloberfläche mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Aktivierungsmarker für B-Zellen angefärbt (vgl 1.1.3.).

In Abbildung 45 A-F sind die verschiedenen Oberflächenantigene im Verlauf von 40 h dargestellt. Da sich die Ergebnisse von APR/8- und A2-Viren entsprechen, sind nur die der A2-Viren dargestellt.

Abbildung 45 A: CD22 ist ein Membranprotein, das auf allen B-Zellen, außer auf Plasmazellen, zu finden ist und an der B-Zell-Aktivierung beteiligt sein soll. Gefunden wurde hier, daß zwischen 80 und 90% der Zellen CD22-positiv sind, sich dieser Zustand im Verlauf der 40 h nicht wesentlich verändert und zudem sowohl bei den Kontrollzellen wie auch bei den mit PWM stimulierten bzw. mit A2 infizierten Zellen gleich war.

Abbildung 45 B: Beim CD25 handelt es sich um den IL-2-Rezeptor mit niedriger Affinität, der auf aktivierten B-Zellen exprimiert ist. Die Zellen waren nahezu zu 100% gefärbt, jedoch waren auch hier keine Unterschiede zwischen den eingesetzten Stimuli zu finden.

Abbildung 45 C: CD69 wird im frühen Stadium der Lymphozyten-Aktivierung exprimiert und soll eine Rolle bei dieser Aktivierung spielen.

Schon nach 24 h sind die zuvor nur zu ca 30% gefärbten Zellen zu fast 100% positiv, jedoch auch wieder unabhängig vom verwendeten Stimulus und ebenso die Zellen der Kontrolle. Folglich scheint die *in-vitro*-Kultivierung schon ausreichender Stimulus für die CD69-Expression zu sein.

## Ergebnisse

---

Abbildung 45 D: Dargestellt ist das CD19-Oberflächen-Antigen, das während aller B-Zell-Differenzierungs- und Reifungsstadien zu finden ist. Es spielt eine Rolle bei der Regulation der B-Zell-Proliferation.

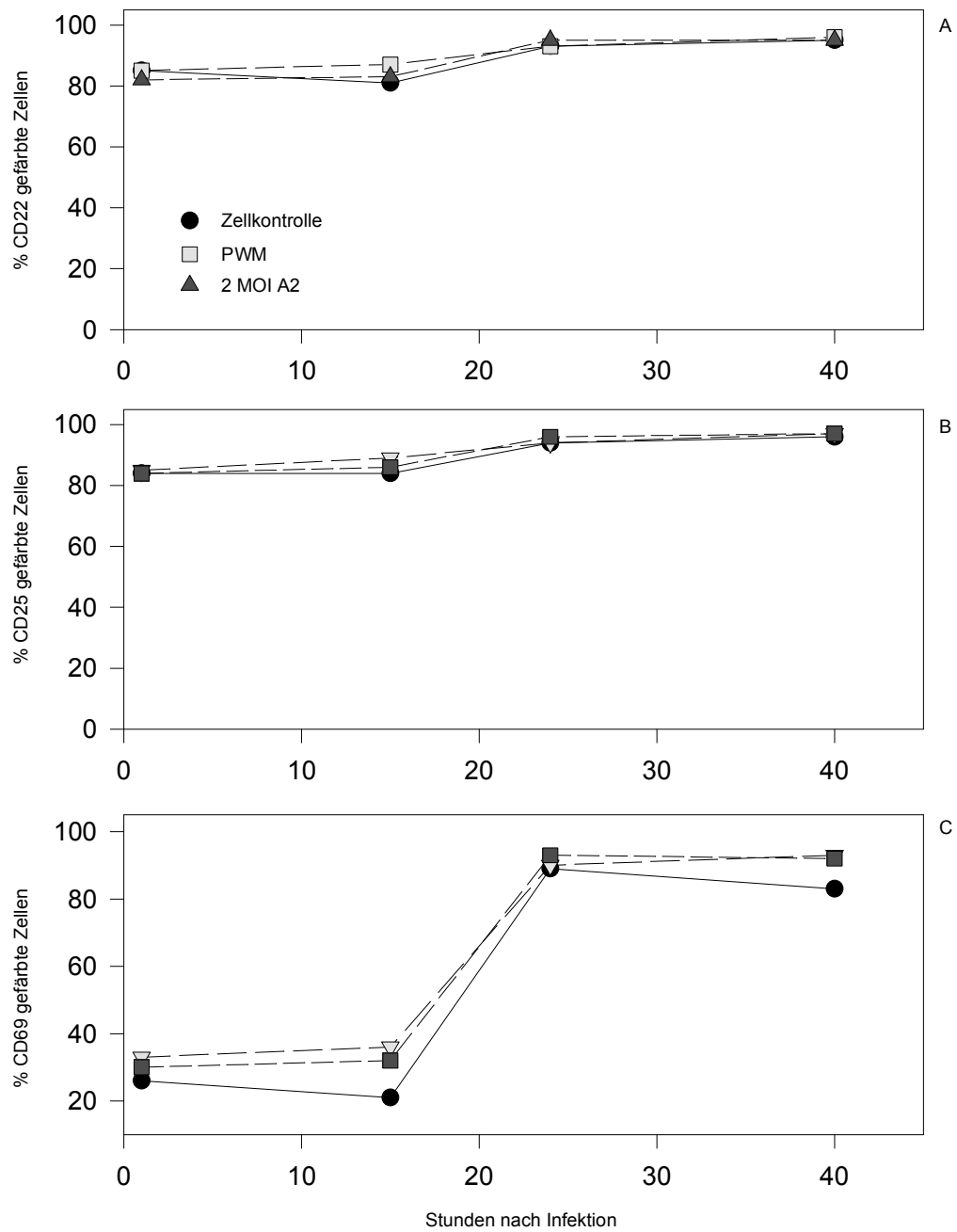
CD19 war während der ganzen Versuchsdauer zu nahezu 100% auf den Zellen exprimiert, jedoch wieder ohne Unterschiede in den stimulierten Zellen oder unstimulierten Kontrollzellen zu zeigen.

Abbildung 45 E und F: Beim CD126 handelt es sich um den Plasmazell-Marker. Außerdem kommt er auf aktivierten B-Zellen vor.

Auf den hier untersuchten Zellen war CD126 zum Zeitpunkt 0 h bei Spender 1 zwar zu finden, die Zellen verloren diesen Marker in Kultur, unabhängig vom eingesetzten Stimulus (Bild E).

Bei einem weiteren Spender konnte dieses Oberflächen-Antigen nicht zum Zeitpunkt 0 h nachgewiesen werden und auch in Kultur unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht induziert werden (Bild F).

## Ergebnisse



## Ergebnisse

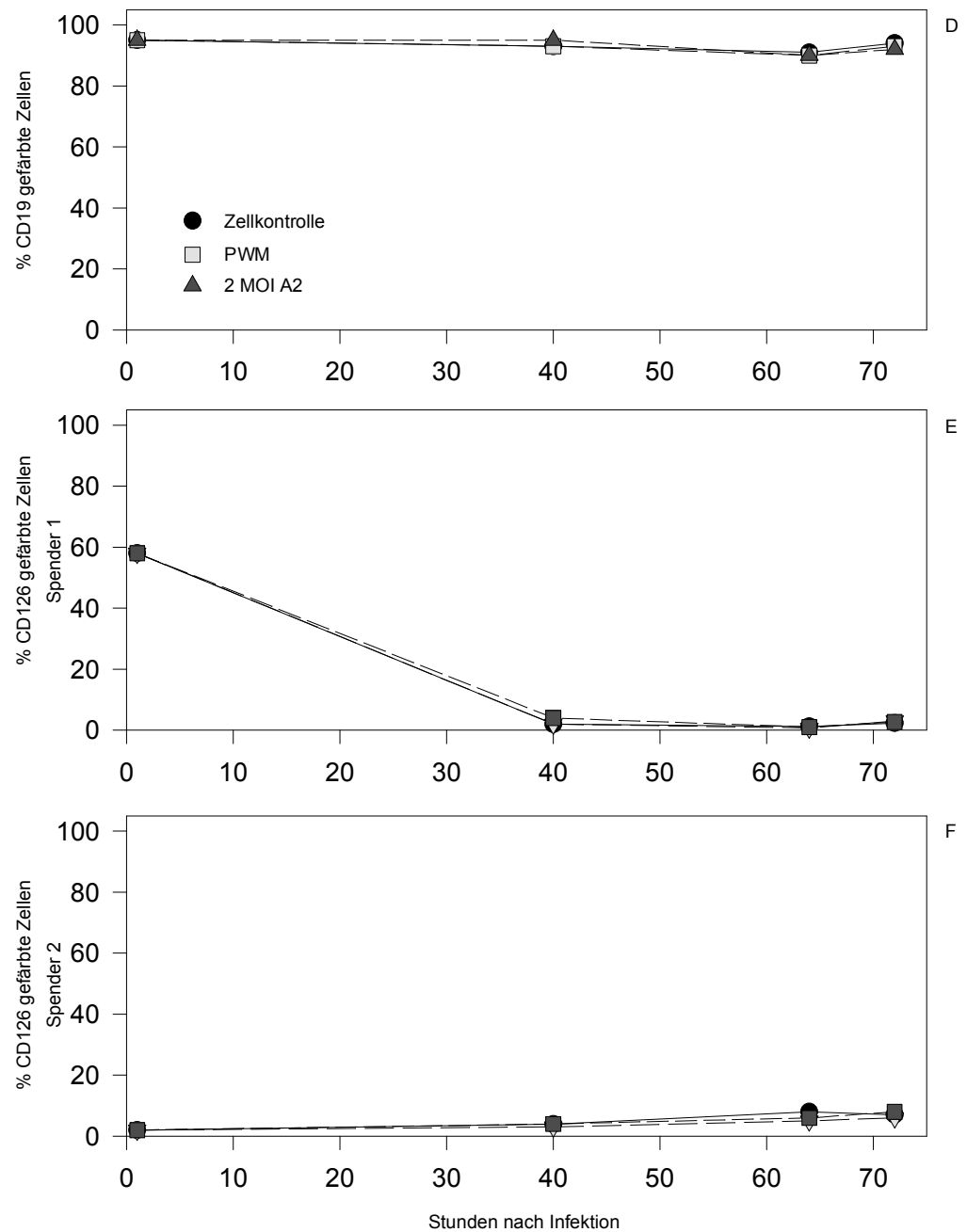


Abb 45: Darstellung verschiedener Oberflächenantigene (A: CD22, B: CD25, C: CD69, D: CD19, E: CD126) tonsillärer B-Lymphozyten mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Ak im FACS. Vergleichend gezeigt wurden die Werte der Zellkontrolle, der mit 10  $\mu\text{g/ml}$  PWM stimulierten Zellen, sowie die der mit 2 MOI A2 infizierten Zellen.

### 3.11. Apoptose

Da in vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde, daß in mit Influenza A infizierten humanen Monozyten Apoptose induziert werden konnte (Fesq et al.,1996), sollte hier untersucht werden, ob dies auch in humanen tonsillären B-Lymphozyten der Fall ist.

Dazu wurden Zytopsin-Präparate mit infizierten tonsillären B-Zellen angefertigt, die dann immunhistochemisch mit Antikörpern gegen *bcl-2* oder *bcl-x* angefärbt oder Zellsuspensionen, die mit Antikörpern gegen CD95 bzw. gegen CD95L mit Hilfe einer FACS-Färbung untersucht wurden.

#### 3.11.1. *Bcl-2*

*Bcl-2* gilt als Apoptose-Inhibitor und seine Expression kann eine Influenza A-Virus-induzierte Apoptose unterdrücken (Olsen et al.,1996).

In Abbildung 46 sind tonsilläre B-Lymphozyten mit Anti-*bcl-2*-Ak gefärbt dargestellt. Bild A zeigt eine negative Kontrolle ohne ersten Antikörper, um eventuelle unspezifische Färbungen aufzudecken. Hier blieb alles ungefärbt, was bedeutet, daß der markierte Zweit-Ak nirgends unspezifisch hängenblieb. Bild B und C zeigen Kontrollzellen zum Zeitpunkt 0 h (B) und 64 h (C). Zum späteren Zeitpunkt waren ein paar wenige Zellen nicht mehr braun angefärbt, was wohl daher rührt, daß die Zellen in Kultur ohne die optimale Stimulation nach ca. 3 Tagen absterben (vgl auch LDH-Assay 3.4.2. und MTT-Nachweis 3.4.3.).

In Bild D, E, F, G und H sind Zellen 64h nach PWM-Stimulation (D), nach APR/8- bzw. A2-Infektion in aktivem (Bild E und G) und inaktivem Zustand (Bild F und H) gezeigt. Auch hier das gleiche Bild: Zum späteren Zeitpunkt waren einige wenige Zellen nicht mehr braun gefärbt, was also kein *bcl-2*-Protein mehr in den Zellen nachzuweisen.

## Ergebnisse

---

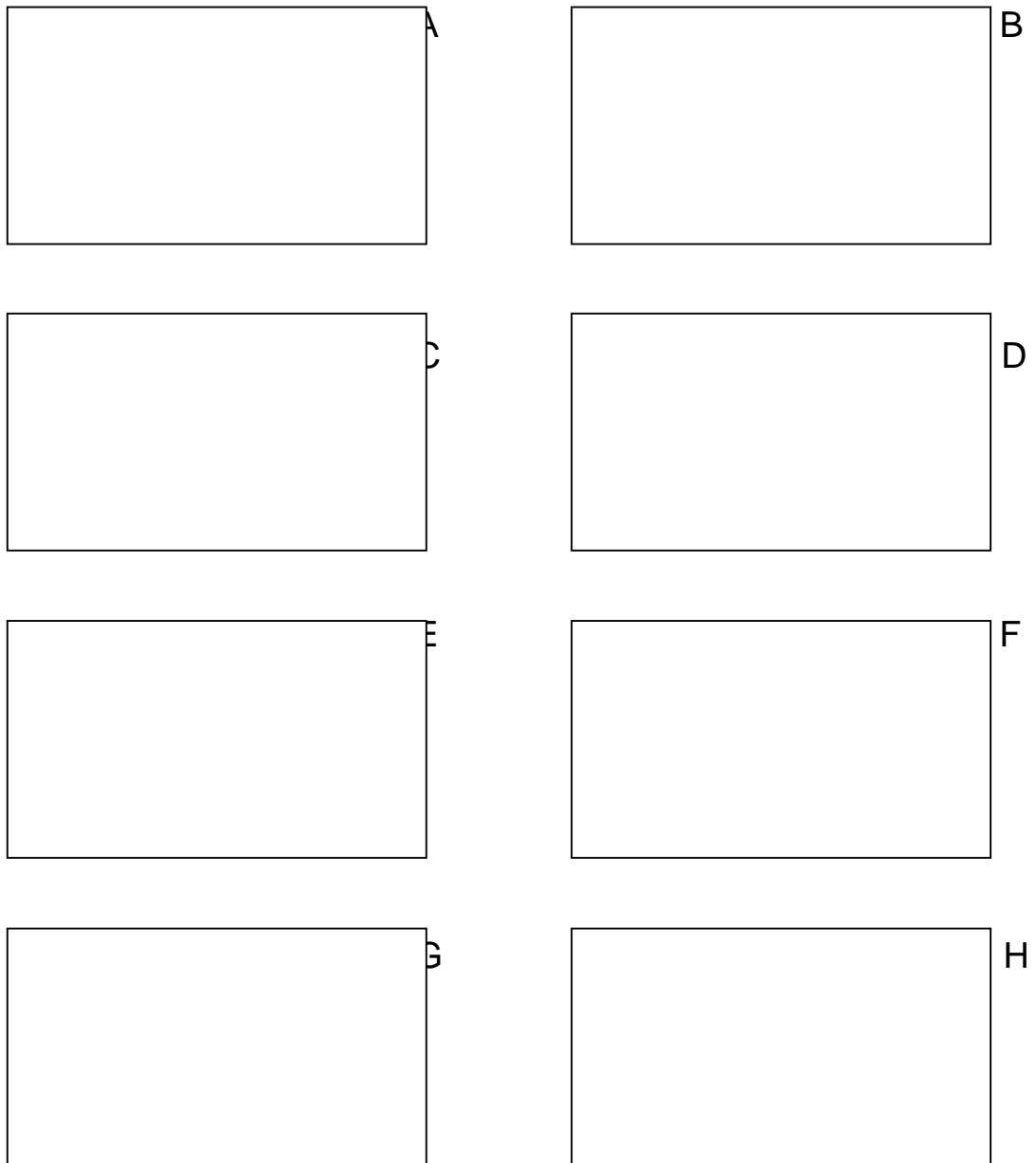


Abb 46: A     Negative Kontrolle ohne ersten Ak  
B     Zellkontrolle 0 h  
C     Zellkontrolle 64 h  
D     PWM 64 h  
E     APR/8 64 h  
F     APR/8 UV 64 h  
G     A2 64 h  
H     A2 UV 64 h

Zum Vergleich ist in Abbildung 47 die Situation mit humanen peripheren Monozyten dargestellt, wo eine deutliche Abnahme des vorhandenen bcl-2-

## Ergebnisse

---

Proteins schon 18 h nach Infektion mit APR/8 (Abb. 47 Bild B) im Vergleich zur Kontrolle zu sehen war (Abb. 47 Bild A).

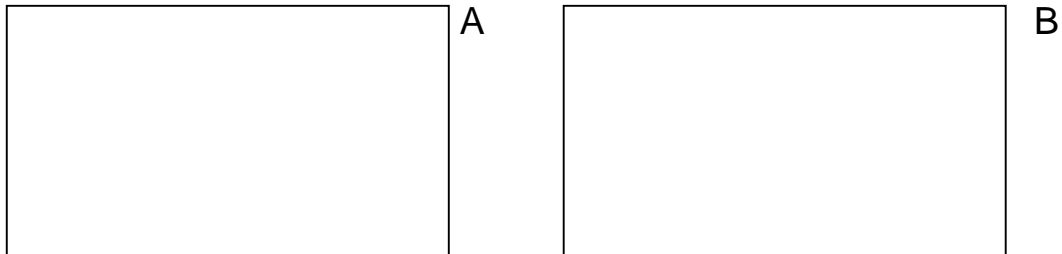
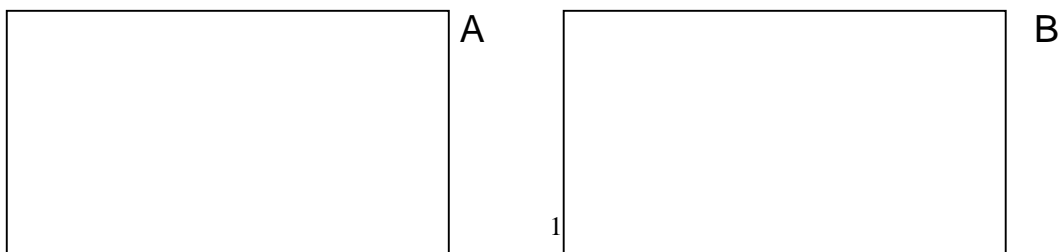


Abb 47: A Kontrollmonozyten  
B APR/8 18 h

### 3.11.2. *Bcl-x*

Es konnte gezeigt werden, daß Mitglieder der bcl-2-Familie vor Apoptose, induziert durch die unterschiedlichsten Stimuli, schützen (Korsmeyer, S. et al., 1992). In B- und T-Zellen macht man hauptsächlich bcl-x dafür verantwortlich (Boise et al., 1995). Hier wurde mit einem Ak gefärbt, der die beiden Isoformen Bcl-X<sub>L</sub> und Bcl-X<sub>S</sub> erkennt.

Im Gegensatz zu Bcl-2, das kappenartig in den Zellen verteilt zu sein scheint, färbte Bcl-X die ganze Zelle braun, was auf eine diffuse Verteilung in der Zelle hindeutet. Sowohl die Kontrollzellen (Bild B) zum Zeitpunkt 0 h, als auch alle anderen Zellen, also Kontrollzellen (Bild C) oder mit APR/8 (Bild D) oder A2 (Bild E) infizierte Zellen, synthetisierten zum Zeitpunkt 64 h noch Bcl-X, das intrazellulär nachzuweisen war.



## Ergebnisse

---

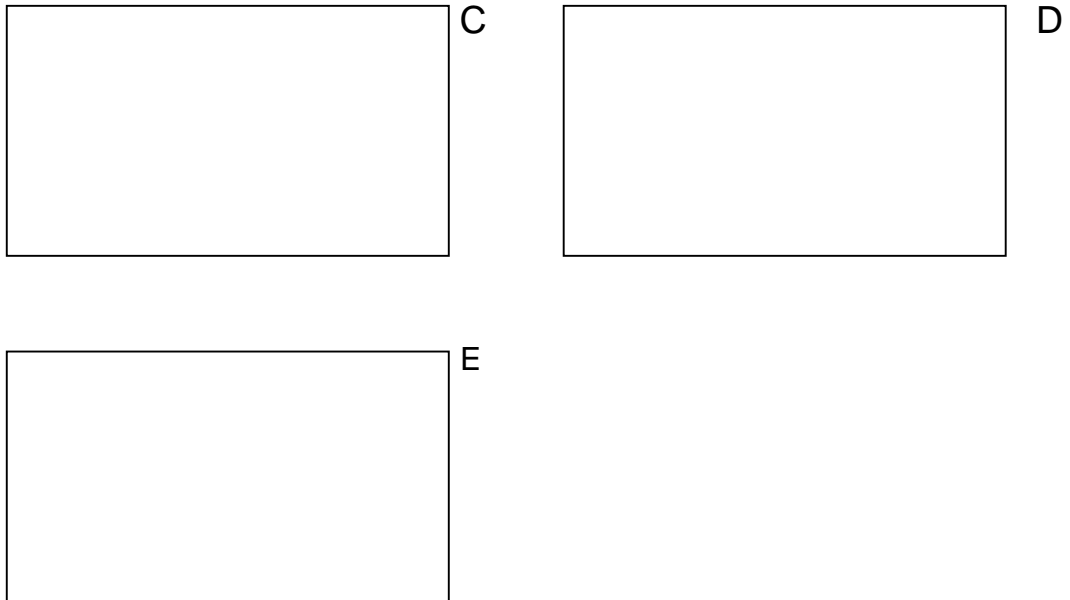


Abb 48: A     Negative Kontrolle ohne ersten Ak  
B     Kontrollzellen 0 h  
C     Kontrollzellen 64 h  
D     APR/8 64 h  
E     A2 64 h



#### 4. Diskussion

Bei einer Influenza-Infektion, im Volksmund einfach als Grippe bezeichnet, handelt es sich um eine Erkrankung des oberen und unteren Respirationstraktes mit Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost und hohem Fieber, dem ein rauher Husten folgen kann.

Daß es sich beim Influenza-Virus um kein harmloses Virus handelt, wird jedem spätestens dann klar, wenn er sich die Morbiditätsraten der einzelnen, alle paar Jahre wiederkehrenden Epidemien genauer betrachtet. So starben z.B. allein in Deutschland im Winter 1957 fast 70.000 Personen, 1962 fast 40.000 Personen, vor allem kleine Kinder und ältere Personen an einer Influenza-Virus-Infektion. Und eine der letzten Epidemien erlebten wir ja alle selbst im Winter letzten Jahres mit. Ein Grund mehr also, sich etwas näher mit diesem Virus auseinanderzusetzen.

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich schon seit geraumer Zeit intensiv und erfolgreich mit den Wechselwirkungen dieses Virus mit unterschiedlichen Immunzellen, wie den Monozyten (Nain et al., 1990), den T-Lymphozyten und den neutrophilen Granulozyten. Über die Wechselwirkungen dieses Virus mit B-Lymphozyten ist der Fachwelt bisher nicht viel bekannt, so daß wir uns dieser Aufgabe stellten.

B-Lymphozyten sind diejenigen Immunzellen, die über Ak-Produktion für die humorale Immunität verantwortlich sind. Sie siedeln sich auf ihrem Weg durch den Kreislauf in den lymphatischen Organen an, aus denen sie deshalb am besten zu isolieren sind. Meine Entscheidung fiel auf tonsilläre B-Zellen, da Tonsillen in der Klinik sehr häufig entfernt werden und mir diese Zellen am ehesten zugänglich waren.

In den nun folgenden Abschnitten werde ich mich damit auseinandersetzen, wie man am besten zu einer reinen B-Zell-Fraktion kommt, welche Wechselwirkungen zwischen diesen Zellen und den Influenza-Viren bestehen und welche Konsequenzen dies sowohl für die Zellen als auch für die Viren hat.

Natürlich handelt es sich hier um ein künstliches System, wenn man den B-Lymphozyten ihre normale Umgebung, die Keimzentren der lymphatischen Organe mit den sie umgebenden T-Lymphozyten, entzieht. Es ist jedoch zur Charakterisierung einer Zellpopulation unerlässlich, sie erst einmal getrennt von anderen Zellen zu betrachten, auch wenn dabei vermutlich viele regulatorische und stimulatorische Mechanismen verloren gehen. Dazu gehören unter anderem die Wechselwirkungen von MHC II, B7 oder CD40 auf der B-Zelle mit dem T-Zell-Rezeptor, CD28 oder CD40-Ligand auf seiten der T-Zellen, die für eine effektive T-Zell-Hilfe unerlässlich sind, was das Krankheitsbild des Hyper-IgM-Syndroms deutlich macht (Conley, M.E. 1992): Im Gen des CD40L kommt es zu Mutationen, so daß dieses Protein entweder überhaupt nicht gebildet wird oder aber nicht in der Lage ist, CD40 zu binden. Die T-Zell-Hilfe über Zytokinausschüttung unterbleibt, so daß kein Antikörper-Switch zu anderen Isotypen erfolgen kann, die Keimzentrumsbildung bleibt aus und man findet auch keine Gedächtniszellen. Deshalb war es um so erstaunlicher, zu welchen Reaktionen die B-Lymphozyten *in vitro* noch fähig waren.

### **Isolierung und Reinheit der B-Zell-Population**

Um die B-Lymphozyten aus den Tonsillen zu isolieren, wurde die Negativselektion gewählt, was bedeutet, daß man all diejenigen Zellen entfernt, mit denen man nicht arbeiten möchte. Da sich außer CD8- und CD4-positiven T-Zellen nur verschwindend wenig andere Zellen in einer Tonsille befinden (siehe Abb. 1 und 2), wurde mit der schon lange erfolgreich angewandten Erythrozyten-Rosettierungsmethode (vgl. 2.2.16.) gearbeitet, wobei alle T-Lymphozyten abgetrennt wurden. Nach diesem Isolierungsschritt wurde eine Reinheit von über 98% an B-Zellen erreicht (Abb. 3), was durch weitere Aufreinigungsschritte nicht mehr gesteigert werden kann, sondern eher zu einem B-Lymphozyten-Verlust führt. Wird eine sehr reine Lymphozytenpopulation ruhender B-Zellen in Stimulationsversuche eingesetzt, sind nach hergebrachter Meinung T-Zell-Zytokine notwendig, um eine Reaktion in den B-Zellen auszulösen (Mond et al. 1983, Thompson et al. 1984). Da hier

jedoch tonsilläre Zellen in die Versuche eingesetzt wurden, haben die Zellen möglicherweise schon eine *in vivo*-Reifung durchlaufen, deren Wirkung zum Zeitpunkt der Isolierung noch anhält, denn wie sonst lassen sich einige der zu einem späteren Zeitpunkt diskutierten Ergebnisse (vgl. 3.5.) erklären?

Eine Positiv-Selektion über Magnet-gekoppelte Ak gegen B-Zell-Oberflächenantigene, wobei nur die gewünschten Zellen gefischt werden, war bei den hier gewählten Fragestellungen nicht angebracht, da z.B. Anti-CD19-Ak eine Rolle bei der Herunterregulation von Wachstum und Proliferation spielen und den Übergang der B-Zellen von der G<sub>0</sub>- in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus hemmen (Pezzutto, A. 1987).

Die verwendeten Virus-Isolate für die nun folgenden Untersuchungen werden in unseren Labors routinemäßig unter sterilen Bedingungen in solch großen Mengen hergestellt, daß alle Versuche mit Isolaten der gleichen Charge durchgeführt werden konnten.

### **Adsorption von Influenza APR/8 und A2 an die B-Zell-Oberfläche, Virusreplikation und Freisetzung intakter Viruspartikel**

Vorraussetzung für eine Infektion der B-Zellen durch Influenza-Viren ist eine langanhaltende Wechselwirkung zwischen den entsprechenden Oberflächenmolekülen, die eine Rezeptor-Ligand-Verbindung eingehen, damit das Virus in die Zelle eindringen kann. In dem vorliegenden Fall dienen Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche als Rezeptoren für die HA1-Moleküle des Virus, posttranslationale Spaltprodukte von HA, die die Infektiosität der Virusmoleküle steigern (Lazarowitz, S.G. 1975) und somit als Ligand funktionieren. Abb. 4 und 5 zeigen mit Hilfe Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Ak gegen APR/8 und A2, daß eine langanhaltende Bindung zwischen Zellen und Virus erfolgte.

Um jedoch eine Infektion der B-Zellen nachzuweisen, reichte die Virusadsorption an die Zelloberfläche allein nicht aus, da nicht zwischen Viruspartikeln unterschieden werden konnte, die nur an die Oberfläche

adsorbiert waren und solchen, die bereits wieder aus den Zellen freigesetzt wurden und daraufhin an den Rezeptoren hängen blieben.

Zur Absicherung meiner Vermutung, daß B-Lymphozyten das Virus auch replizieren können, wurde mittels RT-PCR-Technik die mRNA zweier Virusproteine gesucht. Ausgewählt wurde das Nukleoprotein, das dem RNA-Segment Nr. 5 (Enani, M. 1985) entsprach, mit einer vRNA-Gesamtlänge von 1517 Nukleotiden, davon 1446 codierenden (van Rompuy, L. 1981) und das M-Protein, das dem Segment Nr. 7 entsprach, mit einer vRNA-Gesamtlänge von 1027 Nukleotiden, davon 990 codierenden (Smith, G.L. 1982). Bei dem Nukleoprotein handelte es sich um ein sogenanntes frühes Protein, deshalb wurde es bevorzugt synthetisiert (Shapiro, G. 1987). Da das M-Protein beim Ausschleusen des Virus essentiell ist, muß es auf jeden Fall translatiert werden, damit infektiöse Viruspartikel entstehen können.

In Abb. 6 ist gezeigt, daß die mRNA sowohl für das Nukleoprotein als auch für das M-Protein 0,5 h nach Zusammenbringen von Zellen und Virus in der Zelle vorhanden war. Das Virus mußte folglich in die Zellen eingedrungen sein, vermutlich über rezeptorvermittelte Endozytose, und hatte außerdem mit seinen mitgebrachten viralen Polymerasen unter Zuhilfenahme des zellulären Protein-Synthese-Apparates die Negativ-Strang-RNA in eine Plus-Strang-RNA umschreiben lassen.

Diese Plus-Strang-RNA konnte nur unter der Voraussetzung als mRNA zur Translation verwendet werden, wenn eine bereits synthetisierte 5'Cap-Struktur einer zellulären mRNA entwendet und an die virale RNA angefügt wurde.

Diese Translation in Proteine wurde durch radioaktive Markierung neugebildeter Virusproteine parallel in den B-Zell-Linien IM-9, Raji und in tonsillären B-Lymphozyten untersucht (vgl. Abb. 7-9). In allen drei Zellarten kam es zur Neusynthese von Virusproteinen, wobei das Maximum der Synthese bei den beiden Linien bei 8-9,5 h lag, nach 24 h waren fast keine Proteine mehr nachweisbar. Bei den Primärzellen, die vermutlich einen langsameren Stoffwechsel besitzen, kam es erst nach 24-25,5 h zur maximalen Neusynthese. In anderen Immunzellen wie den Monozyten (vgl. Abb 10) fand man das Synthese-Maximum nach 6-8 h (Bender et al., 1993). In peripheren B-

Lymphozyten konnte keine Virusprotein-Neusynthese nachgewiesen werden, was vermutlich an der mangelnden Zellausbeute lag (gezeigt in meiner Diplomarbeit). In peripheren Th-Zellen konnte, obwohl virale mRNA in den Zellen nachweisbar war, keine Protein-Neusynthese und auch keine Virusfreisetzung nachgewiesen werden (Dissertationsarbeit Katrin Mayer).

Die nächste Frage, die sich mir nun stellte, war, ob eine Ausschleusung intakter infektiöser Viruspartikel erfolgte. Dazu wurden Plaquetests durchgeführt und zwar vergleichend bei Monozyten und B-Zellen jeweils mit APR/8 und A2. Es fiel auf, daß B-Zellen erheblich mehr infektiöses Virus freisetzen als Monozyten (Abb. 11 A). Da diese Zellen jedoch das Virus, wie schon vorhin erwähnt, freisetzen, indem sie einfach zugrunde gingen, konnten sie so gezwungenermaßen keinen Stoffwechsel mehr aufrecht erhalten. Des weiteren zeigten Untersuchungen, daß Influenza-Viren in humanen Monozyten Apoptose induzieren können (Fesq et al. 1996), die Zellen also in den programmierten Zelltod schickten, so daß natürlich auch aus diesem Grunde keine weitere Proteinsynthese mehr ablief.

Es wurde beobachtet, daß mehr infektiöses A2-Virus aus den tonsillären B-Lymphozyten freigesetzt wurde als APR/8-Virus. Ein Grund dafür könnte sein, daß die Stoffwechselaktivität der Zellen mancher Spender nach APR/8-Infektion im Gegensatz zur A2-Infektion verringert war (gemessen am Umsatz von MTT, vgl. Abb 19 und 20), so daß eventuell auch die restliche Proteinsynthese durch eine Virusinfektion beeinträchtigt war. Auch ruhende periphere B-Zellen setzten hundertmal weniger Viruspartikel frei, was wohl von ihrem vergleichsweise trägen Stoffwechselumsatz herrührt (vgl Abb. 11 B), da ihre vorrangige Aufgabe nur darin besteht, an den Ort des Geschehens, also den lymphatischen Organen, in denen sich erst die Antigen-Erkennung abspielt, zu gelangen.

Eine wichtige Voraussetzung für die Infektiosität von Influenza-Viren ist die Spaltung des HA-Moleküls in HA1 und HA2, denn Partikel mit ungespaltenem HA sind nicht in der Lage, an weitere Zellen anzudocken, da sie keinen passenden Rezeptor finden. Man kann diese Spaltung auch *in vitro* durch Trypsin erreichen (Klenk et al. 1975), weshalb der B-Zell-Überstand vor dem

Übertragen auf permissive Zellen mit Trypsin behandelt wurde (vgl. 2.2.7.1.). Die Infektiosität, hier gezeigt am Beispiel des A2 in Abb. 11 C, konnte nochmal verdoppelt werden, was bedeutet, daß zweimal mehr Viruspartikel entstanden waren, als zuvor nachgewiesen wurden. Die B-Lymphozyten wirken hier wie eine Virusfalle: Da sie zwar gezwungen werden, das Virus zu replizieren, können sie dieses Virusdiktat modulieren, indem sie nichtinfektiöses Virus freisetzen.

Im Gegensatz zu Ergebnissen von Mock et al. (1987), in denen dargestellt wurde, daß Monozyten zur Influenza-Infektion von Lymphozyten gebraucht werden, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß B-Lymphozyten ohne Hilfszellen durch Influenza APR/8- und A2-Viren infiziert werden. Da eine hochreine Lymphozytenpopulation eingesetzt worden war (vgl. Abb. 3 A-F), wurde hier ausschließlich die Wechselwirkung zwischen B-Zellen und Influenza-Viren untersucht. Auch ohne Zusatz weiterer Substanzen waren die B-Zellen in der Lage, das Virus zu replizieren (Abb. 6) und teilweise intakte Viruspartikel freizusetzen (Abb. 11 A-C).

Über die Fähigkeit von Viren, B-Zellen zu infizieren, lagen schon einige Erkenntnisse vor. So wird berichtet, daß periphere Blut-Lymphozyten (PBL) mit Influenzavirus infizierbar sind, B- und T-Zellen wurden jedoch nicht getrennt untersucht. Weitere Negativ-Strang RNA-Viren, die in der Lage sind, Lymphozyten zu infizieren, sind Masern-, Mumps-Virus, RSV, VSV und Parainfluenza-Viren. Von anderen Viren wie Hepatitis B, Epstein-Barr Virus, Rubella, HIV ist bekannt, daß sie humane B-Zellen befallen können (Mc Chesney, M.B. 1987).

Um überhaupt Aussagen über irgendwelche Reaktionen der B-Lymphozyten auf eine Influenza-Virus-Infektion machen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, ob die Zellen noch am Leben sind. Deshalb untersuchte ich zunächst die Lebensfähigkeit der Zellen mit unterschiedlichen Testsystemen.

### **Vitalität der B-Lymphozyten**

Es ist bekannt, daß B-Lymphozyten ohne Zugabe von diversen Stimuli innerhalb von 3-4 Tagen absterben (Valentine, M.A. 1992). Deshalb ist der Vitalitätsverlust der Zellkontrolle auf 80% normal (vgl. Abb. 12 und 13).

Hier sollte untersucht werden, ob eine Virusinfektion mit APR/8 oder A2 zu einem schnelleren Absterben führte. Mit Hilfe von Trypanblau, einem Farbstoff, der tote Zellen anfärbt, wurde in Abb. 12 dargestellt, wie die Werte der infizierten Zellen um die der Kontrollzellen schwankten, nach 4 Tagen lagen sie etwas darunter. Es gab also keine Hinweise darauf, daß die virusinfizierten Zellen schneller abstarben.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von toten Zellen in einer Kultur ist die Messung von LDH im Zellkultur-Überstand. Da es sich dabei um ein intrazelluläres Enzym handelt, das nicht sezerniert wird, kann es nur durch Zell-Lyse in den Überstand freigesetzt werden. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Werten der Zellkontrolle und der infizierten Zellen (Abb. 13). Der Anstieg der Kurve spiegelte die erwartete Absterberate der in Kultur gehaltenen Zellen wider.

Anders verhielten sich jedoch die Ergebnisse des MTT-Tests, der die Stoffwechselaktivität einer mitochondrialen Dehydrogenase mißt, was nicht mit Vitalität gleichgesetzt werden kann, da eine (noch) lebende Zelle ja durchaus ihre Stoffwechselaktivitäten hoch- oder herunterregulieren kann.

Hier wurden die beiden Zell-Linien Raji und IM-9 vergleichend mit hinzugezogen, da Linien eine höhere Stoffwechselaktivität als Primärzellen besitzen und sich Unterschiede deshalb besser erkennen lassen. Sowohl bei den Raji- als auch bei den IM-9-Zellen zeigte sich, daß die Aktivität der Zellen nach Virusinfektion nicht so stark anstieg wie die der sich normal vermehrenden Kontrollzellen (Abb. 14-17). Da es sich bei diesen beiden Zell-Linien um Zellen im Lymphoblastenstadium, also noch um unreife Vorläuferzellen handelt, können ihre Reaktionen auch anders ausfallen als die der tonsillären B-Lymphozyten, die z.T. durch andere Oberflächenmarker gekennzeichnet sind.

Sowohl bei peripheren (Abb. 18) als auch bei tonsillären (Abb. 19) B-Lymphozyten nahm die Stoffwechselaktivität nach APR/8-Infektion im Verlauf von drei Tagen auf 80% ab, dagegen hemmte A2 die Aktivität nicht (Abb. 20). Wurde APR/8 in inaktiviertem Zustand zu den Zellen gegeben, kam es nicht zur Aktivitätsminderung, was den Schluß zuläßt, daß nur infektiöses, replizierfähiges Virus Einfluß auf die Stoffwechselaktivität nehmen kann. In Abb. 18 ist ein deutlicher Stoffwechselaktivitätsverlust bei humanen Monozyten nach APR/8-Infektion zu sehen, was möglicherweise auf die in den Zellen ausgelöste Apoptose zurückzuführen ist, da es in den Zellen zum DNA-Abbau kam und diese Zellen natürlich nicht mehr in der Lage sind, ihren Stoffwechsel aufrechtzuerhalten.

In Abb. 21 A und B ist die Dosisabhängigkeit der Stoffwechselaktivität nach Infektion mit verschiedenen Influenza-Viren dargestellt, jeweils auf nicht *in vitro* aktivierte und auf mit PWM aktivierte B-Zellen. Dieser Versuchsansatz erfolgte im Hinblick auf Versuche, die unter 3.5., Abb. 24 und 25, aufgeführt werden. Auch hier zeigte sich, daß, unabhängig von der Dosis, alle eingesetzten Viren keinen negativen Einfluß auf die Aktivität nahmen, sondern sie sogar leicht steigerten. Bei diesem Spender verminderte selbst APR/8 die Aktivität nicht (Abb. 21 A). Wurde der gleiche Versuch zusätzlich unter PWM-Einfluß durchgeführt, das eine proliferative Wirkung in B-Zellen auslöst, kam es nach APR/8-Infektion zu einer drastischen Verringerung der Aktivität, die z. Zt. nicht erklärbar ist.

Wir haben jetzt also gesehen, daß die wichtigste Voraussetzung, die Lebensfähigkeit der Zellen, nicht durch Virusinfektionen herabgesetzt war, so daß ich mich als nächstes mit der Beeinflussung von Funktionssystemen beschäftigen konnte. Dazu gehören vor allem die Proliferationsfähigkeit der B-Lymphozyten, die ein Zeichen dafür ist, daß die Zellen in einen aktivierten Zustand gelangen und nach entsprechender Stimulation sogar in das Plasmazellstadium übergehen, in welchem sie zur Antikörper-Produktion befähigt sind. Diese Ereignisse laufen in der Regel unter sehr kontrollierten Bedingungen ab. Das bedeutet, daß nur B-Zellen, die ihr entsprechendes Ag



gefunden haben, auch wirklich aktiviert werden. Zusätzlich benötigen sie ein zweites Signal, das z.B. von T-Zellen in Form bestimmter Zytokine übermittelt wird. Dies stellt einen Schutzmechanismus dar, der verhindern soll, daß durch Anergie „stillgelegte“ B-Lymphozyten, die Eigenantigene erkennen, unkontrolliert aktiviert werden.

Des weiteren wurde die Zytokin- und Interferonausschüttung untersucht, da B-Zellen prinzipiell alle Zytokingene wie andere Immunzellen besitzen, so daß es nur eine Frage der Regulation und nicht des Könnens ist, ob Zytokine von den Zellen sezerniert werden.

Da auch auf dem relativ neuen Arbeitsgebiet der Chemokine noch nicht viel über deren Produktion in B-Zellen bekannt war, wurden in der vorliegenden Arbeit die Erfahrung und Techniken, die in unseren Labors schon seit längerem vorhanden sind, eingesetzt, um mehr darüber zu erfahren, wie B-Lymphozyten auf eine Influenza-Infektion reagieren, vor allem, weil uns schon die verschiedensten Erkenntnisse über Reaktionen anderer Immunzellen vorliegen (Sprenger et al. 1996).

### **Proliferation humaner tonsillärer B-Zellen**

Das Phänomen der polyklonalen B-Zell-Aktivierung, also einer nicht-Ag-spezifischen Aktivierung, bei der viele B-Zellen gleichzeitig durch dieselbe Substanz zur Proliferation angestoßen werden, ist keineswegs neu. Schon 1966 beschrieben Notkins et al. nach Lactat-Dehydrogenase-Virusinfektion erhöhte  $\gamma$ -Globulin- und Ak-Spiegel in Mäusen. Im Laufe der Jahre wurden noch weitere Viren als Mitogene beschrieben: Herpes Simplex Virus (Mochizuki et al. 1977, Kirchner et al. 1978), Vesicular Stomatitis Virus (Goodman-Snitkoff et al., 1980), Sindbis Virus (Goodman-Snitkoff et al., 1982), Sendai Virus (Kizaka et al., 1983) und Influenza Virus (Butchko et al., 1978). 1974 konnten Virelizier et al. zeigen, daß das Hämagglutinin (HA) von Influenza-Virus eine Ak-Produktion in Mäusen auslöste. 1979 beschrieb die Gruppe um Margot Anders die *in vitro*-Synthese von Ak gegen HA, wobei sie zunächst davon

ausgingen, daß die Antwort T-Zell-abhängig war. Einige Jahre später zeigten sie jedoch, daß es sich um T-Zell-unabhängige B-Zell-Antworten handelte. Gleichzeitig unterteilten sie unterschiedliche HA-Subklassen in stark- und schwach-mitogen (Anders et al., 1984). Wieder ein Jahr später hatten sie die Bindungsstelle für das HA gefunden: MHC I-E (Anders et al., 1985). Sie führten die Versuche mit  $\beta$ -D-octyl-Glucosid-isoliertem HA durch, das seine mitogene Wirkung weiterhin besaß, im Gegensatz zu HA, das mit Hilfe des Detergenz SDS isoliert worden war. Diese Befunde zeigten, daß die Dreidimensionalität dieses Moleküls vermutlich eine wichtige Rolle für die Wechselwirkung mit der Lymphozytenmembran spielt.

Einige Jahre spielte sich auf diesem Gebiet ziemlich wenig ab, weil vermutlich die Brisanz dieses Themas noch nicht erkannt worden war, bis sich 1994 eine deutsch-französische Arbeitsgruppe zu Wort meldete (Rott, O. und Cash, E., 1994). Sie griff die vorherigen Ergebnisse wieder auf und erweiterte sie entscheidend. Es wurden zwölf unterschiedliche HA-Subtypen untersucht, die in eine Gruppe mit hohem, mittlerem und niedrigem Aktivierungspotential eingeteilt wurden. Zugabe von Zytokinen wie IL-1 oder IL-4 zeigten keinen Einfluß, woraus diese Gruppe unter anderem schloß, daß es sich um eine T-Zell-unabhängige B-Zell-Aktivierung handelte (Rott et al., 1995).

Thymus-unabhängige (TI) B-Zell-Antworten lassen sich in zwei Gruppen einteilen, und zwar bezüglich ihrer „Unabhängigkeit“ von T-Zellen:

TI-1-Ag sind komplett T-Zell-unabhängig, das heißt, es handelt sich um polyklonale Aktivatoren von B-Zellen, die unabhängig von der B-Zell-Rezeptorspezifität den größten Teil der B-Zellen stimulieren, so daß diese proliferieren, sich differenzieren und Ak produzieren. Das beste Beispiel hierfür ist das Lipopolysaccharid (LPS), was aber nur für das Mäuse-System zutrifft oder das PWM, das im humanen System diese Reaktion auszulösen vermag. Es kommt also zu einer Aktivierung, ohne daß ein Ag an den Ig-Rezeptor gebunden hat, was üblicherweise zur Signalauslösung führt. Da keine T-Zellen beteiligt sind, fällt die T-Zell-Hilfe durch Zytokin-Ausschüttung aus, so daß kein

Isotyp-Wechsel stattfinden kann, es zu keiner Affinitätsreifung und zu keiner Gedächtniszell-Produktion kommt.

TI-2-Ag zeigen *in vitro* keine Ak-Antwort, wenn man alle T-Zellen entfernt hat. Trotzdem bezeichnet man sie als T-Zell-unabhängig, weil sie in athymischen Mäusen spezifische Ak-Antworten hervorrufen, deren Mechanismus man jedoch nicht genauer kennt. Dazu gehören Polysaccharide mit vielen identischen antigenen Epitopen, wie z.B. Dextran und Ficoll. Sie erreichen eine maximale Vernetzung der Membran-Ig auf spezifischen B-Lymphozyten, also die antigenen Strukturen passen zufällig an die Rezeptoren, so daß es zur Aktivierung ohne T-Zell-Hilfe kommt, da Polysaccharide nicht prozessiert und auf MHC-Molekülen T-Zellen präsentiert werden können. Sie gelten jedoch nicht als polyklonale Aktivatoren, da nicht alle B-Zell-Klone stimuliert werden. Es stellt sich nun natürlich die Frage, zu welchem Typ Ag die Influenza A-Viren gehören. Bei den dem Immunsystem angebotenen Strukturen handelt es sich um die Phospholipidmembran und um die Glykoproteine HA und NA, von denen man weiß, daß sie nicht an den Ig-Rezeptor binden, sondern an ihren Liganden, die Sialinsäure-Reste, die wohl alle B-Zellen zu besitzen scheinen, da das Virus an fast alle Zellen andocken kann (vgl. Abb. 4 und 5). Die Stärke der in den Zellen ausgelösten Proliferationsreaktion entspricht der der PWM-Stimulation oder übertrifft sie noch um ein Vielfaches, wobei es sich bei der PWM-Stimulation, wie oben beschrieben, um eine polyklonale Aktivierung handelt (vgl. Abb. 23-27). Bei meinen Untersuchungen konnte jedoch keine *in vitro*-Ak-Produktion nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt), was typisch für eine TI-1-Antwort wäre. Außerdem benötigt man replizierfähiges Virus, was im Gegensatz zu den Untersuchungen von Rott et al., 1995 steht, die mit UV-inaktivierten Viren die gleichen Resultate erzielen konnten.

Deshalb denke ich, daß Influenza A als Ag für humane B-Zellen nicht in das bisher bestehende Ag-Schema einzuordnen ist.

Solch eine polyklonale B-Zell-Stimulierung hat weitere Konsequenzen für das Immunsystem: Die Reaktivierung funktionell stillgelegter, selbstreaktiver B-Lymphozyten durch polyklonale Aktivierung kann zur Durchbrechung peripherer

B- und T-Zell-Toleranz führen, was unter Umständen zur Manifestation von Autoimmunerkrankungen führen kann (Cash et al. 1996). Experimente zeigten, daß wiederholte Influenza-Virusinfektionen in Balb/c-Mäusen zur Folge hatten, daß RF-ähnliche Auto-Ak im Serum auftraten. Auch bei persistierenden Infektionen kam es zur B-Zell-Stimulation (Rott et al. 1995). In transgenen Mäusen konnte durch gewebespezifische HA-Expression im Pankreas Diabetes ausgelöst werden.

Im humanen System wurde erstmals 1993 eine Autoantikörper-Produktion nach HIV-Infektion beschrieben (Muller et al. 1993, Ditzel et al. 1994).

In der vorliegenden Arbeit konnte zum erstenmal gezeigt werden, daß auch Influenza-Viren in humanen B-Lymphozyten eine Proliferation auslösen konnten (Abb. 22-27). Tonsilläre Zellen vor der B-Zell-Isolierung, also ein Zellgemisch aus überwiegend B- und T-Lymphozyten (vgl. Abb. 1 und 2), wurden mit B- und T-Zell-Mitogenen versetzt und inkubiert (Abb. 22). Die Zellen proliferierten nach PWM-Gabe, worauf eine zusätzliche APR/8-Infektion keinen Einfluß hatte. Da ein Signal auszureichen schien, um diese Reaktion auszulösen, mußte später noch untersucht werden, ob Zytokine im Spiel waren, die eine autokrine Wirkung ausüben konnten. Die T-Zell-Mitogene blieben ohne Wirkung, woraus man schließen konnte, daß hier ein einziges Signal zur Auslösung der Reaktion nicht ausreichte. Deshalb verwundert es auch nicht weiter, daß Abb. 23 das gleiche Ergebnis zeigte, da hier eine reine B-Zell-Population eingesetzt worden war. In Anlehnung an alle vorausgegangenen Veröffentlichungen (Anders et al. 1979, Anders et al. 1984, Anders et al. 1985, Rott et al. 1994, Rott et al. 1995), wurden hier Influenza-Viren mit unterschiedlichen HA-Subtypen in die Versuche eingesetzt (Abb. 24), gleichzeitig wurde die Dosisabhängigkeit untersucht und als Kontrolle, ob die Zellen des Spenders überhaupt in der Lage waren zu proliferieren, zusätzlich PWM zugegeben (Abb. 25).

Überraschenderweise zeigte auch hier ein H2-Virus eine auffallende Proliferationserhöhung, denn auch schon bei Mäuse-B-Zellen konnte gezeigt werden, daß H2 eine stark-mitogene Wirkung hatte (Anders et al. 1984). Alle anderen eingesetzten Influenza-Viren zeigten keine Wirkung, auch konnte

keine Dosisabhängigkeit ausgemacht werden. Wurde gleichzeitig PWM zugesetzt, zeigte sich kein additiver Effekt bei den Zellen, die mit A2 infiziert worden waren, so daß es sich hier wohl eher um eine Alles-oder Nichts-Reaktion handelte. Warum es bei TUR-Infektion und PWM-Stimulation zu einer so drastischen „Nicht-Reaktion“ kommt, ist unklar. Die MTT-Ergebnisse (vgl. Abb. 21 B) zeigten keine verringerte Stoffwechsel-Leistungen, ein gestörter Metabolismus kann also nicht als Grund angenommen werden.

Da bei allen zitierten Versuchen UV-inaktivierte Influenza-Viren eingesetzt wurden, mußte im nächsten Schritt überprüft werden, ob auch im humanen System inaktivierte Viren eine Proliferation auslösen. Wie in Abb. 26 und 27 dargestellt ist, konnten UV-inaktivierte Viren nur eine Proliferation in gleichem Maße wie PWM auslösen, wohingegen aktives A2-Virus eine dreifach höhere Reaktion induzierte. Cash et al. (1996) konnten die proliferativen Antworten unterteilen in gering, ausgelöst durch H1, H7, H10, und H11, in mittel, induziert durch H3, H5, H8, und H9, und stark, ausgelöst durch H2, H4, H6 und H12. Eine solche Einteilung ließ sich im humanen System nicht erkennen, aber das reaktivste Virus, das A2, war ein H2-Virus, das auch im Mäuse-System zu den Viren zählte, das eine starke Proliferation auslöste. Wie in Abb. 27, einer Kinetikdarstellung des Proliferationsverlaufs, gezeigt ist, handelte es sich bei diesen Proliferationsereignissen *in vitro* um Reaktionen, die nicht sofort einsetzten, denn ein BrdU-Einbau erfolgte erst nach frühestens drei Tagen- *in vivo* beginnt die Proliferation schon nach ca. 12 h-, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß die Zellen aus ihrer gewohnten Umgebung entnommen und völlig isoliert aktiviert wurden.

Da inaktives Virus und isoliertes HA (Abb.26) nicht ausreichten, die Zellen zu stimulieren, stellte sich natürlich die Frage nach dem Funktionsmechanismus. Allein das Andocken an (s)einen Rezeptor reicht wohl nicht aus, um eine Signalkaskade in Gang zu bringen. Es werden weitere Versuche folgen, die uns Klarheit darüber verschaffen sollen, ob H2 innerhalb der Signalleitung eine Funktion übernehmen kann, die zum Proliferationsereignis führt. Andere Virusproteine sollten keine Rolle spielen, da Influenza-Viren bis auf HA und NA die übrigen Proteine teilen.

### **Zytokinfreisetzung der B-Lymphozyten**

Bisher betrachtete man die B-Zellen vorwiegend von der Seite aus, daß sie auf Zytokine reagieren. Dazu gehört die Auslösung der Proliferation durch die Interleukine IL-2, IL-4 und IL-5 oder der Ak-Isotyp-Wechsel. IL-4, IL-6, IL-2 und IFN- $\gamma$  führen einen Wechsel vom IgM zu IgG herbei, IL-5 und TGF- $\beta$  zu IgA und IL-4 zu IgE. Inwieweit B-Lymphozyten selbst aktiv an der Zytokinausschüttung beteiligt sind, darüber lagen noch sehr wenige Informationen vor.

Im Juli 1997 bereicherte Herr Pistoria mit einem Übersichtsartikel über die Zytokinproduktion humaner B-Lymphozyten die Fachliteratur. Seiner Meinung nach müssen B-Zellen, um Zytokine freisetzen zu können, aktiviert werden, entweder durch T-Zell-unabhängige B-Zell-Aktivatoren, durch Aktivatoren, die T-Zell-abhängige Aktivatoren imitieren, oder durch eine *in vivo*-Aktivierung. Dann sind sie in der Lage, sowohl proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF und LT, als auch hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie G-CSF, GM-CSF, M-CSF und IL-7 oder immunsuppressive Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10 zu produzieren. Diese Zytokine können parakrine Effekte auf sogenannte Bystander-Zellen ausüben - dies können T-Zellen sein, aber genauso gut auch Makrophagen, NK-Zellen oder follikuläre dendritische Zellen - oder autokrine Funktion übernehmen und die Reifung, Proliferation, Differenzierung u.v.m. regulieren. Später zieht er nach kritischer Einschätzung drei Schlußfolgerungen:

1. Es gibt keinen *in vitro* oder *in vivo* Hinweis darauf, daß B-Zellen eine zentrale Rolle bei der Kontrolle irgendwelcher Zellen spielen.
2. B-Zellen sind absolut entbehrlich für die erfolgreiche Durchführung zellvermittelter Immunantworten.
3. B-Zell-Zytokine können bestehende zelluläre Reaktionen in spezialisierten Mikroumgebungen, wie z.B. Lymphfollikel und KM-Stroma, modulieren.

Weiterhin hält er eine autokrine Wirkung für sehr unwahrscheinlich, da auch die B-Zell-Lymphopoese, das B-Zell-Wachstum, die B-Zell-Apoptose und die -Aktivierung strengstens von anderen Zellen kontrolliert ist.

Meiner Meinung nach läßt er hier die mitogene Wirkung vieler Stoffe, unter anderem auch die durch Viren ausgelöste Stimulation, völlig außer acht, weshalb er von falschen Voraussetzungen ausgeht. Außerdem geht es ja nicht nur um die richtig gesteuerten Funktionen, sondern vor allem darum, was passieren kann, wenn dieses fein ausgeklügelte System entgleist. Und daß dieses System Mängel aufweist, sieht man an „Fehlsteuerungen“ wie Allergien und Autoimmunerkrankungen.

Soviel also zur Vorgeschichte, was die Zytokinproduktion in B-Zellen betrifft.

Kann man vielleicht Parallelen zwischen Reaktionen auf PWM und aktivem A2-Virus finden, da die beiden „Stimuli“ ja zum gleichen Ergebnis, der Proliferation, die durch BrdU-Einbau nachgewiesen werden konnte, führten?

Um diese Fragen beantworten zu können, untersuchte ich die Zytokinfreisetzung der B-Lymphozyten nach Zugabe der jeweiligen Stimuli, vielleicht konnte ich ja ähnliche Zytokinmuster finden (vgl. Abb. 28-31 B), da Zytokine wie IL-2, IL-3, IL-4 oder IFN- $\gamma$  die durch Mitogene ausgelöste Differenzierung von B-Zellen beeinflussen können (Snapper et al. 1988, Splawsky et al. 1990).

Stellvertretend für einige wichtige B-Zell-Zytokine wurden IL-4, IL-5 und IL-6 herausgegriffen und auf Proteinebene im Zellkulturüberstand untersucht. IL-4 konnte bei keinem Spender gefunden werden (ohne Abb., vgl. 3.6.3.), IL-5 nur nach PWM-Zugabe (Abb. 28) und IL-6 in großen Mengen nach Infektion mit aktiven Viren (APR/8 und A2), was mit peripheren Zellen in einer früheren Untersuchung ebenfalls schon gezeigt werden konnte (Abb. 29). Nach Zugabe inaktivierter Viren und PWM konnte es nur in geringen Mengen nachgewiesen werden (Abb. 30). Auch TNF- $\beta$  konnte nur nach PWM-Stimulation im Zellkulturüberstand gefunden werden (Abb. 31 A und B).

Diese Ergebnisse zeigten, daß PWM und Viren wohl völlig andere Signalwege auslösen, die auch nicht in der Produktion gleicher Zytokine münden. Was die

Ursache der Proliferation nach Infektion mit A2-Virus sein könnte, darüber müssen noch weitere Überlegungen angestellt werden, denen die entsprechenden Untersuchungen folgen werden.

Ein weiteres wichtiges und nicht zu übersehendes Zytokin ist das IFN- $\gamma$ , das außer in der Virusabwehr noch wichtige immunmodulatorische Aufgaben erfüllt, wie die Induktion von F<sub>c</sub>-Rezeptoren, von MHC-Molekülen, Regulation der Zytokin-Gen-Expression, weiterhin die Aktivierung und Differenzierung verschiedener Effektor-Zellen einschließlich der Monozyten und B-Lymphozyten. Auch konnte gezeigt werden, daß es die Ig-Synthese und den Ig-Klassenwechsel beeinflusst. *In vivo* scheint seine Synthese aufs strengste reguliert zu sein, da man es bis jetzt nur in aktivierten Zellen nachweisen konnte. 1992 konnte IFN- $\gamma$  von Pang et al. in Überständen zweier B-Zell-Linien gefunden werden, woraus sie schlußfolgerten, daß in B-Zellen die notwendigen Werkzeuge, sprich Transkriptionsfaktoren, zur IFN- $\gamma$ -Produktion vorhanden sind und 1994 beschrieben Jelinek et al., daß es von humanen B-Lymphozyten produziert werden sollte. Jelinek et al. fanden IFN- $\gamma$  in hohen Mengen nach IL-12 Stimulation, wobei sie selbst einschränkend bemerkten, daß diese Mengen wohl eher von T- und NK-Zellen stammen dürften, denn als sie die mit den B-Zell-Stimuli SA und IL-2 stimulierten Überstände untersuchten, fanden sie IFN- $\gamma$  nur unterhalb der Nachweisgrenze.

In der vorliegenden Arbeit, in der mit hochreinen B-Zell-Isolaten gearbeitet worden war, fand sich IFN- $\gamma$  in hohen Mengen nach PWM-Zugabe (Abb. 32 A) und in immer noch sehr gut nachweisbaren Mengen nach Infektion mit UV-inaktivierten Viren (Abb. 32 B). Influenza-Viren hemmen die allgemeine Zellprotein-Synthese, da sie die Zelle veranlassen, nur noch Virusproteine zu produzieren, was die nur geringe IFN- $\gamma$ -Produktion nach Infektion mit aktivem Virus erklären könnte (Abb. 32 B). Unstimulierte B-Lymphozyten setzten kein IFN- $\gamma$  frei (Abb. 32 A und B), was den vorher erwähnten Befunden entspricht.

Im folgenden Abschnitt werde ich mich mit der Produktion eines weiteren Zytokins beschäftigen, dem Typ I-Interferon oder auch Interferon- $\alpha$  genannt. Manchmal nennt man es auch Leukozyten-Interferon im Gegensatz zum



Fibroblasten-Interferon, dem IFN- $\beta$ , das auch zur Gruppe der Typ I-Interferone gehört. Der potenteste Stimulus für die Produktion dieser beiden Zytokine ist eine virale Infektion.

### **Interferon-Freisetzung tonsillärer B-Zellen**

IFN- $\alpha$  ist ein Zytokin, das von mononukleären Leukozyten produziert wird und das für die angeborene Immunität gegenüber viralen Infektionen wichtig ist. Dieses Zytokin ist in der Lage, virale Replikation durch Induktion antiviraler Faktoren und durch Modulation der zytotoxischen Immunantwort zu hemmen (Ferbass et al., 1995). Außer diesen antiviralen und immunmodulatorischen Aktivitäten kann es antiproliferativ wirken (Greenway et al., 1995), in einigen Situationen soll es auch als B-Zell-Differenzierungsfaktor dienen können (Exley et al., 1987).

Virus-infizierte Blut-Leukozyten exprimieren relativ große Mengen an mRNA von IFN- $\alpha_1$ , - $\alpha_2$ , - $\alpha_4$  und - $\beta$ , wohingegen die mRNA von IFN- $\alpha_5$ , - $\alpha_7$  und - $\alpha_8$  in geringeren Mengen vorhanden ist. Das Gen-Expressions-Muster in den von den Autoren verwendeten Lymphoblasten-Zell-Linien war ähnlich, auch wenn verschiedene Viren als Induktor eingesetzt wurden (Adolf et al., 1992). Sie äußerten die starke Vermutung, daß IFN- $\alpha_2$  für mindestens 90% der konstitutiv produzierten IFN-Aktivität verantwortlich ist. Auch Greenway et al. fanden 1995 heraus, daß alle T- und B-Lymphozyten IFN- $\alpha_2$  und - $\alpha_4$  konstitutiv exprimierten. Aufgrund dieser Vorbefunde beschränkten wir unsere Suche in den molekularbiologischen Bereichen auf IFN- $\alpha_2$  (vgl. 2.2.11.1. und 2.2.11.2.). Diese früheren Ergebnisse stehen im Einklang mit den von mir gefundenen Resultaten, dargestellt in Abb. 33 und 34, wo sowohl mit Hilfe der PCR als auch im Northern Blot gezeigt werden konnte, daß die IFN- $\alpha_2$ -mRNA konstitutiv in allen Proben und zu allen Zeiten in B-Lymphozyten nachzuweisen war. Daß Influenza-Viren als IFN-Induktor geeignet sind, konnte bis jetzt nur in adherenten Zellen, wie in Monozyten/Makrophagen, nachgewiesen werden (Brandt et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde also zum ersten Mal gezeigt, daß Influenza-Viren, und zwar unabhängig davon ob es sich um APR/8

oder A2 handelte, in tonsillären B-Zellen eine IFN- $\alpha$ - und - $\beta$ -Translation auslösen konnten und das Protein auch in den Zellkultur-Überstand abgegeben wurde (siehe Abb. 35-38). Auch meine Untersuchungen ergaben, wie schon 1995 von Ferbas et al. beschrieben, daß die Viren nicht notwendigerweise aktiv sein müssen. In Abb. 38 A und B ist gezeigt, daß UV- und 56°C-inaktivierte APR/8- und A2-Influenzaviren genauso gut IFN induzierten wie die Viren, die noch vermehrungsfähig waren. Das läßt den Schluß zu, daß entweder das Andocken des Virus an die Zelle ausreicht, ein entsprechendes Signal auszulösen oder zumindest ein sehr früher Schritt in der Replikationsphase innerhalb der Wirtszelle dafür verantwortlich ist. Die Ergebnisse, wie Brandt et al. 1994 beschrieben, daß Poly I:C, bei Zellen wie Monozyten als der IFN-Induktor schlechthin bekannt, in peripheren Blutzellen eine viel geringere IFN-Produktion auslöste, konnte ich in separierten hochreinen tonsillären B-Zell-Populationen bestätigen (vgl. Abb.35-37). Die Autoren schlußfolgerten daraus einen unterschiedlichen posttranskriptionellen Kontrollmechanismus nach Einsatz unterschiedlicher Induktoren, da man bei der IFN- $\beta$ -Translation im 3'- und 5'-Bereich Signalsequenzen gefunden hat, die involviert sein sollen, dies leider jedoch für die Translation der IFN- $\alpha$ -mRNA noch nicht bestätigen konnte.

Im nächsten Kapitel, in dem ich mich näher mit der Chemokin-Produktion der tonsillären B-Lymphozyten beschäftigen werde, betrat ich ziemliches Neuland im Bereich der B-Zell-Forschung, so daß ich meist nicht in der Lage war, auf schon vorhandene Literatur bzw. Daten zurückzugreifen. Ausgezeichnete Dienste lieferten mir die Vorarbeiten von Sprenger et al. (1996) und Bußfeld et al. (1997), die in unseren Labors mit Monozyten/Makrophagen nach APR/8- und VSV-Infektion durchgeführt worden waren.

### **Chemokinproduktion tonsillärer B-Lymphozyten**

Im umfangreichen Feld der Zytokine wurde vor einigen Jahren eine große Gruppe strukturell homologer Moleküle gefunden, die alle die Fähigkeit besitzen, Leukozyten zur Fortbewegung zu veranlassen. Es ist die Familie der

Chemokine, die andere Zellen entlang eines chemischen Gradienten an die Orte einer Immunreaktion locken. Aus der enorm großen Anzahl der schon bekannten Chemokine wurde von uns eine kleine Auswahl getroffen, die erst einmal zeigen sollte, ob es sich lohnt, auf diesem unbekannten Felde zu forschen. Unsere Wahl fiel auf das IL-8, von dem 1993 zum erstenmal berichtet wurde, daß es in peripheren B-Zellen produziert wird (Srivastava et al.). 1994 untersuchte die Arbeitsgruppe um die Zelle in B-CLL-Zellen die IL-8-Expression, die sich als konstitutiv erwies, was 1997 von Nielsen et al. für periphere B-Lymphozyten bestätigt wurde. Da es sich beim IL-8 um ein C-X-C-Chemokin handelt, suchten wir uns mit dem MCP-1 und MIP-1 $\alpha$  und - $\beta$  noch zwei Vertreter der C-C-Chemokine aus, über die bis jetzt noch keine Erkenntnisse vorliegen, was ihre Produktion in B-Lymphozyten betrifft.

Wie in Abb. 39 A-C zu sehen ist, produzierten die tonsillären B-Lymphozyten *in vitro* konstitutiv, also ohne Stimulation IL-8, das sich im Überstand im Laufe der Zeit ansammelte. PWM-Stimulation schien keinerlei Einfluß auf diese Sekretion zu haben (Abb. 39 A). Wurden die Zellen mit Influenza-Viren infiziert, waren die aktiven APR/8- und A2-Viren in der Lage, die Produktion zu supprimieren, wobei APR/8 eine stärkere Hemmung bewirkte. Wurden UV-inaktivierte Viren eingesetzt, zeigte sich fast kein Unterschied zur Produktion in den Kontrollzellen (Abb. 39 B und C). Auch in B-Zellen scheint IL-8 intrazellulär in Vesikeln gespeichert zu werden, da es relativ schnell freigesetzt werden kann. Für Monozyten konnte man dies nachweisen. Allerdings unterschieden sich die Reaktionen der Monozyten zu denen der B-Zellen in einem Punkt wesentlich: Monozyten sezernierten IL-8 nur nach LPS-Stimulation in den Zellkultur-Überstand, was aber durch Ko-Infektion durch APR/8 oder VSV reduziert werden konnte. Auch die freigesetzten Mengen der Monozyten unterschieden sich wesentlich von denen der B-Lymphozyten. Monozyten setzten ca. 25 mal mehr als B-Zellen IL-8 frei. Vielleicht übernimmt IL-8 ja noch ganz andere Aufgaben, als das Anlocken der Neutrophilen, Aufgaben, die entscheidende Bedeutung in ganz speziellen Mikroumgebungen haben, wo eine dauerhafte geringe Chemokin-Produktion ausreichend ist.

Ein ähnliches Reaktionsmuster boten die Ergebnisse der MCP-1-Freisetzung (Abb. 40 A-C). Auch hier konnten die aktiven Viren, ebenso wie PWM, die konstitutive Produktion verringern, inaktivierte Viren zeigten keine Wirkung. Da MCP-1 ein Chemokin ist, das T-Zellen anlockt, verwundert diese Reaktion keineswegs, denn eine B-Zelle wird immer die Wechselwirkung zu einer T-Zelle herzustellen versuchen, da sie auf T-Zell-Hilfe für ihre weiteren Aktivierungsschritte angewiesen ist. Ist nun ein Virus in der Lage, diese Wechselwirkung in irgendeiner Weise zu verringern, also eine Immunantwort abzuschwächen oder gar zu unterbinden, stellt dies eine effektive Überlebensstrategie für das Virus dar.

Etwas anders verhält es sich mit der MIP-1 $\alpha$ - und - $\beta$ -Produktion. Die unstimulierten Zellen setzten von sich aus nur sehr wenig MIP-1 $\alpha$ - und - $\beta$  frei. Hier kam es nach PWM-Stimulation und Virus-Infektion zu einer Erhöhung der Chemokin-Produktion (vgl. Abb. 41 A-C und 42 A-C), was in immunologischer Hinsicht Sinn macht, da auch MIP-1 $\alpha$ - und - $\beta$  auf T-Zell-Populationen wirkt und diese Zellen rekrutiert, so daß es nach einem Ag-Kontakt von B-Zellen, gleichgültig ob das Virus aktiv war oder nicht, zu einer Annäherung zwischen diesen beiden Zell-Typen kommt, die eine Aktivierung und somit eine Immunantwort nach sich ziehen kann.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß es sich hierbei um ein lohnenswertes Arbeitsgebiet handelt, so daß hier in jedem Fall noch weiterführende Studien durchgeführt werden sollten, vor allem, da man inzwischen diskutiert, daß Chemokine die Expression unterschiedlicher „homing“-Rezeptoren beeinflussen können (Luster A.D. 1998), wobei vielleicht auch so geringen, auf den ersten Blick unbedeutenden Mengen an freigesetzten Chemokinen große Bedeutung beigemessen werden könnte, so daß man auf alle neuen Erkenntnisse sehr gespannt sein darf.

Wie schon weiter oben erwähnt, versuchte ich Parallelen in der Aktivierung zwischen der Stimulation mit PWM und der Infektion mit A2 zu finden, um dem Geheimnis dieses doch sehr erstaunlichen Ergebnisses des BrdU-Einbaus

(Abb. 22-27) etwas näher auf die Spur zu kommen, so daß ich hoffte, daß die Untersuchung bestimmter Oberflächenmarker von B-Lymphozyten, hier wurden CD19, CD22, CD25, CD69 und CD126 gewählt, eine Auskunft über ihren Aktivierungszustand geben und so indirekt etwas über den Signalweg erfahren werden kann.

Ein weiteres, in diesem Zusammenhang interessantes Molekül, ist das CD23, der  $F_{c\epsilon}$ -Rezeptor mit niedriger Affinität, von dem seit nicht allzu langer Zeit auch noch andere biologische Aktivitäten, wie z.B. die Regulation der Proliferation normaler B- und T-Zellen, beschrieben wurden (Luo, H. et al. 1991; Armitage, R.J. 1989).

### **Oberflächenexpression von CD19, CD22 CD23, CD25, CD69 und CD126**

Beginnen möchte ich mit dem CD23-Molekül, da es kein Aktivierungsmarker ist, sondern inzwischen andere Funktionen zugeordnet bekommen hat.

Da Ak gegen CD23 ein Progressionssignal für aktivierte B-Zellen vermitteln, diese dadurch veranlassen, in den Zell-Zyklus einzutreten (Cairns et al. 1988) und sCD23 das Überleben und die Differenzierung von B-Zellen in den Keimzentren beeinflusst (Gordon et al. 1991), wurde die CD23-Expression in IM-9-Zellen und tonsillären B-Lymphozyten unter Viruseinfluß untersucht. In Abb. 43 wurde gezeigt, daß die Expression auf den IM-9-Kontrollzellen im Laufe der Zeit abnahm. A2 schien keinen Einfluß auf diese Expression zu haben, aber APR/8 hemmte sie drastisch. Da es sich bei dieser Zell-Linie um Zellen handelt, die CD23 konstitutiv exprimieren, war es interessant zu erfahren, wie Primärzellen unter Viruseinfluß reagieren würden.

Abb. 44 A zeigt, daß die Expression der Kontrollzellen über 7 Tage konstant blieb, APR/8 und A2 diese Expression jedoch schon innerhalb eines Tages supprimieren konnten. Möglicherweise handelte es sich hier um eine autokrine Wirkung von IFN- $\alpha$  und - $\gamma$ , von denen beschrieben wurde, daß sie die CD23-Expression unterdrücken können (Delespesse et al. 1989, TeVelde et al. 1990, Denoroy et al 1990), denn, wie wir gesehen haben, kam es nach Virusinfektion der B-Lymphozyten zur Sekretion von IFN- $\alpha$  (vgl. Abb. 36-38) und IFN- $\gamma$  (Abb.

32 B). Seit 1987 ist bekannt, daß IL-4 in der Lage ist, die CD23-Expression auf normalen B-Zellen zu induzieren (Defrance et al.) und auch diese Induktion soll durch IFN- $\gamma$  unterdrückbar sein (Pfeil et al. 1989). Abb. 44 B zeigt, daß zwar IL-4 in der Lage war, die CD23-Expression zu erhöhen, die Virusinfektion aber keinen eindeutigen Einfluß auf diese Expression hatte, daß sie nach APR/8-Infektion eher leicht anstieg. Da in der Literatur nichts darüber zu finden war, ob auch IFN- $\alpha$  in der Lage ist, eine IL-4-induzierte CD23-Expression zu hemmen, könnte es sein, daß es sich bei der Unterdrückung der konstitutiven Expression um eine indirekte Wirkung des IFN- $\alpha$  handelte. Wurde die Expression durch Zugabe von IL-4 in Kombination mit Anti- $\mu$  erhöht, konnte keinerlei Einfluß von Viren auf diese Expression nachgewiesen werden.

Bei allen weiteren untersuchten Oberflächenmarkern (Abb. 45 A-F), bei denen es sich um Proteine handelt, die entweder direkt etwas mit B-Zell-Aktivierung zu tun haben oder nach Aktivierung der B-Zellen auf deren Oberfläche erscheinen, konnten keinerlei Expressionsunterschiede zwischen den Zellen der Kontrolle und den stimulierten bzw. infizierten Zellen gefunden werden.

Bevor ich eine Schlußfolgerung aus all den vorliegenden Ergebnissen ziehe, möchte ich mich dem letzten Aspekt zuwenden: B-Lymphozyten und Apoptose. Da auch hierüber in unserer Arbeitsgruppe hervorragende Studien über die Reaktionen von Monozyten auf Influenza-Infektionen durchgeführt wurden, versuchte ich, unser Wissen zu erweitern, indem ich den bisherigen Erkenntnissen die Reaktionen der B-Zellen dazufügte.

### **B-Zellen und Apoptose**

Apoptose, oder programmierter Zelltod, ist ein wichtiger Mechanismus zur B-Zell-Eliminierung zu verschiedenen Stadien während ihrer Entwicklung und Differenzierung. Auch extrazelluläre Agentien können die Signalkaskade in Gang setzen, die in den Zellen Gen-Regulationsveränderungen auslösen, die dann zur Apoptose führen.

Wichtige Moleküle bei der Regulation sind bcl-2 und bcl-x: Bcl-2 ist ein integrales Membran-Protein der äußeren Mitochondrien-Membran und des rauen endoplasmatischen Retikulums und wirkt ebenso wie das bcl-x, das in der Peripherie der Mitochondrien lokalisiert ist, als Repressor der Apoptose in Lymphozyten. Geringe Expression von bcl-2 und bcl-x ist ein gemeinsames Merkmal aller Entwicklungs-Stadien, in denen Apoptose und klonale Selektion vorkommt (Korsmeyer, S.J. 1992; Hibner, U. 1993; Nunez, G. 1994).

Wie in Abb. 46 B-H dargestellt, nahm die bcl-2-Expression in tonsillären B-Lymphozyten weder in den Kontrollzellen noch in den PWM-stimulierten oder virusinfizierten Zellen ab, was bedeutet, daß einer der Faktoren, der die Apoptose verhindert, anwesend blieb. Ebensoles galt für bcl-x, wie in Abb. 48 B-E zu erkennen ist, so daß es sehr unwahrscheinlich ist, daß in B-Zellen durch eine Influenza-Infektion Apoptose ausgelöst wird. Hier zeigte sich wieder einmal, daß die einzelnen Immunzellen durchaus in der Lage sind, unterschiedlich auf bestimmte „Fremdstoffe“ zu reagieren, da Monozyten, wie in Abb. 47 A-B gezeigt, schon 18 h nach Virusinfektion keine Expression von bcl-2 mehr aufwiesen.

Durch die vorangegangenen Untersuchungen konnten zwar viele neue Erkenntnisse über B-Lymphozyten und ihre Reaktionen auf Virusinfektionen gewonnen werden, jedoch ist es bis jetzt leider nicht gelungen, Klarheit in zugrunde liegende Funktionsmechanismen zu bringen. Dies sollte Aufgabe zukünftiger Forschungsarbeiten sein, denn ich glaube, daß die B-Zell-Forschung ein lohnenswertes Arbeitsgebiet darstellt, wenn man bedenkt, daß die Zahl der Autoimmunerkrankungen immer weiter ansteigt, an denen fehlgesteuerte Funktionen von B-Lymphozyten ja nicht unbeteiligt sind. Außerdem deuten neueste Erkenntnisse darauf hin, daß über CD40 stimulierte B-Zellen sehr effiziente antigenpräsentierende Zellen sind, die vermutlich genau so gut geeignet sind wie dendritische Zellen, um antigenspezifische T-Zellen *ex vivo* für eine autologe adoptive Immuntherapie herzustellen (Schultze et al., 1997).

### 5. Zusammenfassung

Bisher konnte nur sicher dokumentiert werden, daß unter den Zellen des Immunsystems primär Monozyten und Makrophagen durch Influenza A-Viren infizierbar sind. Monozyten und Makrophagen sezernieren bei dieser Infektion eine große Palette von proinflammatorischen Zytokinen, die für einen erheblichen Teil der Krankheitssymptomatik verantwortlich gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage gestellt, ob die primär Ak-produzierenden B-Lymphozyten nach Influenza A-Virus-Infektion, ähnlich wie Monozyten und Makrophagen eine grundlegende Funktionsänderung erfahren. B-Lymphozyten lassen sich aus Tonsillen mit einer Reinheit von über 98% isolieren. Zugegebene Influenza A-Viren adsorbierten lang genug an der Zelloberfläche, um in die Zellen aufgenommen zu werden. In den B-Lymphozyten wurden die Viren repliziert, was mittels PCR, Virusprotein-Neusynthese und Virusfreisetzung abgesichert wurde. Auch die beiden eingesetzten Lymphoblasten-Zell-Linien Raji und IM-9 konnten Virusproteine synthetisieren. Die B-Zellen setzten um ein Vielfaches mehr infektiöse Viruspartikel frei als Monozyten, die nach Infektion in die Apoptose getrieben wurden. In B-Zellen wurde Apoptose nicht induziert, was durch die ständige Anwesenheit von Bcl-2 und Bcl-x nachgewiesen wurde. Auch nahm die Vitalität und die Stoffwechselaktivität nach Influenza-Infektion in den B-Zellen nicht ab, im Gegensatz zu Monozyten, was durch LDH-Nachweis, Trypanblau-Färbung und MTT-Umsatz gemessen wurde.

Mittels BrdU-Einbau konnte gezeigt werden, daß nicht nur das Lektin PWM in der Lage war, eine polyklonale Stimulierung in den B-Zellen auszulösen, sondern auch das A2-Virus, jedoch nur in seiner aktiven Form. Diese Reaktion setzt *in vitro* erst am dritten Tag ein, was vermutlich damit zusammenhängt, daß es sich um ein recht artifizielles Test-System handelt, in dem die B-Lymphozyten als isolierte Zellen verzögert antworten.

Um herauszufinden, ob die B-Zellen nicht nur als reagierende Zellen zu betrachten sind, sondern sich selbst aktiv an Produktion und Netzwerk der Zytokine beteiligen, wurde die Synthese einiger ausgewählter Zytokine und



Chemokine untersucht: Eine IL-4-Produktion konnte nicht nachgewiesen werden, aber IL-5, TNF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  wurden nach PWM-Stimulation, und IL-6 und IFN- $\gamma$  nach Infektion mit aktiven Influenza-Viren im Überstand nachgewiesen. Die konstitutive Produktion von IL-8 und MCP-1 konnte durch Influenza-Virus-Infektion vermindert werden, wobei sie von aktivem APR/8 vollständig unterdrückt wurde. Durch UV-Inaktivierung der Viren konnte dieser Effekt wieder aufgehoben werden. Im Gegensatz dazu kam es nach Infektion mit Virus zu einer Produktion von MIP-1 $\alpha$ - und - $\beta$ , wohingegen die Stimulation mit PWM keine Wirkung zeigte.

IFN- $\alpha/\beta$ , dessen mRNA konstitutiv im Zytoplasma vorliegt, wurde sowohl nach Infektion mit aktivem als auch UV-inaktiviertem Virus nach 2 h in den Zellkultur-Überstand abgegeben.

Um Informationen über den Aktivierungszustand der Zellen zu bekommen, wurde mittels FACS-Analyse eine Reihe von Oberflächen-Aktivierungsmarkern wie CD25, CD69 und CD126 untersucht, was jedoch keinen näheren Aufschluß erbrachte, da sich kaum Änderungen fanden. Die konstitutive Expression von CD23, dem F $_{c\epsilon}$ -Rezeptor mit niedriger Affinität, konnte durch APR/8 und A2 unterdrückt werden, jedoch nur dann, wenn die Zellen vorher nicht mit IL-4 oder Anti- $\mu$  behandelt waren, die beide einen Induktor für CD23 darstellen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen somit sehr eindeutig, daß B-Lymphozyten dramatische Funktions-Änderungen nach Influenza A-Virus-Infektion aufweisen. Obwohl eine Ak-Produktion nicht nachzuweisen war, zeigten die B-Zellen Veränderungen der Proliferationsfähigkeit und darüber hinaus fand sich eine deutliche Zytokin- und Chemokin-Produktion. B-Lymphozyten repräsentieren deshalb einen integralen Bestandteil des Zytokin-Netzwerkes, das bei akuten und chronischen Infektionen das Ausmaß der Immunreaktivität mitbestimmt. Es muß also postuliert werden, daß B-Lymphozyten bei Infektionen mit Influenza A-Viren nicht nur über Ak-Produktion, sondern auch über Zytokin-Freisetzung das Infektionsgeschehen kontrollieren.

**Adolf**, G.R.; Pieler, C.; Maurer-Fogy, I. (1992): Constitutive Production of Interferon- $\alpha_2$  by a Human B-Lymphoblastoid Cell Line. J. of Interferon Research 12: 275-280.

**Alt**, F.W.; Blackwell, K.T.; Yancopoulos, G.D. (1987): Development of the primary antibody repertoire. Science 238: 1080-1084.

**Anders**, M.E.; Peppard, P.M.; Burns, W.H.; White, D.O. (1979): In Vitro Antibody Response to Influenza Virus. I T Cell Dependence of Secondary Response to Hemagglutinin. J. of Immunol. 123: 1356.

**Anders**, E.M.; Scalzo, A.A.; White, D.O. (1984): Influenza Viruses Are T Cell-Independent B Cell Mitogens. J. of Virology 50: 960-963.

**Anders**, E. M.; Scalzo, A.A.; White, D.O. (1985): Mitogenic activity of influenza virus and hemagglutinin. Vaccine 3: 241-246.

**Armitage**, R.J.; Goff, L.K.; Beverley, P.C.L. (1989): Expression and functional role of CD23 on T cells. Eur. J. Immunol. 19:31-35.

**Baggiolini**, M.; Dewald, B.; Moser, B.(1994): Interleukin-8 and related chemotactic cytokines- CXC und CC chemokines. Adv. Immunol. 55, 97-179.

**Bender**, A.; Amann, U.; Jäger, R.; Nain, M.; Gerns, D. (1993): Effect of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on human monocytes infected with influenza A virus: Enhancement of virus replication, cytokine release, and cytotoxicity. J. Immunol. 151: 5416-5424.

**Boise**, L.H.; Gonzalez-Garcia, M.; Postema, C.E.; Ding, L.; Lindstein, T.; Turka, L.A.; Mao, X.; Nunez, G.; Thompson, C.B. (1993): Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic death. Cell 74: 597-608.

**Bonnefoy**, J.Y.; Aubery, J.P.; Peronne, C.; Wijdenes, J; Banchereau, J. (1987): Production and characterization of a monoclonal antibody specific for the human lymphocyte low affinity receptor for IgE: CD23 is a low affinity receptor for IgE. *J Immunol.* 138: 2970.

**Brain**, P. ; Gordon, J. Willetts, W.A. 1970: Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin Exp. Immunol.* 6: 681-688.

**Brandt**, E.R.; Linnane, A.W.; Devenish, R.J. (1994): Expression of IFN A genes in subpopulations of peripheral blood cells. *Br. J. Haematol.* 86: 717-725.

**Bußfeld**, D.; Kaufmann, A.; Gemsa, D.; Sprenger, H. (1998): Differential mononuclear leucocyte attracting chemokine production after stimulation with active and inactivated influenza A virus. *Cell. Immunol.* In print

**Butchko**, G.M.; Armstrong, R.B.; Martin W.J.; Ennis, F.A. (1978): Influenza A viruses of the H2N2 subtype are lymphocyte mitogens. *Nature* 271: 66-67.

**Cairns**, J.A.; Flores-Romo, L.; Millsum, M.J.; Guy, G.R.; Gillis, S.; Ledbetter, J.A.; Gordon, J. (1988): Soluble CD23 is released by B lymphocytes cycling in response to interleukin 4 and anti-Bp50 (CDw40). *Eur. J. Immunol.* 18:349-354.

**Cairns**, J.A.; Gordon, J. (1990): Intact 45 kDa (membrane) form of CD23 is consistently mitogenic for normal and transformed B lymphoblasts. *Eur. J. Immunol.* 2: 1078

**Carswell**, E.A.; Old, L.J.; Kassel, R.L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 3666-3670.

**Clark**, E.A.; Ledbetter, J.A. (1986): *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 83: 4494.

**Clark**, E.A.; Lane, P.J.L. (1991): Regulation of human B-cell activation and adhesion. *Ann Reviews of Immunol.* 9: 97-127.

**Colotta**, F.; Sciacca, F.L.; Sironi, M.; Luini, W.; Rabiet, M.J.; Mantovani, A. (1994): Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed of thrombin. *Am. J. Pathol* 144: 975-985.

**Conley**, M.E. (1992): Molecular Approaches to analysis of X-linked immunodeficiencies. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 215-238.

**Coombs**, R.R.A. ; Gurner, B.W. ; Wilson, A.B. ; Holm, G. ; Lindgren, B. (1970): Rosette-formation between human lymphocytes and sheep red blood cells not involving immunoglobulin receptors. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 39: 653-658.

**Cory**, S. (1995): Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu Rev. Immunol.* 13: 513-543.

**Defrance**, T.; Aubry, J.P.; Rousset, B.; Vanbervliet, B.; Bonnefoy, J.Y.; Arai, N. (1987): Human recombinant IL-4 induces FcE receptors (CD23) on normal B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 165: 1459-1464.

**Delespesse**, G.; Sarfati, M.; Peleman, R. (1989): Influence of recombinant IL-4, IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  on the production of human IgE binding factor (soluble CD23). *J. Immunol.* 142: 134-138.

**Denoroy**, M.C.; Yodoi J.; Banchereau, J. (1990): Interleukin 4 and interferons  $\alpha$  and  $\gamma$  regulate Fc $\epsilon$ R2/CD23 mRNA expression on normal human B cells. *Mol. Immunol.* 27: 129-134.

**Di Celle**, P.F.; Carbone, A.; Marchis, D.; Zhou, D.; Sozzani, S.; Zupo, S.; Pini, M.; Mantovani, A.; Foa, R. (1994): Cytokine Gene Expression in B-Cell Chronic

Lymphocytic Leukemia: Evidence of Constitutive IL-8 mRNA Expression and Secretion of Biologically Active IL-8 Protein. *Blood* 84: 220-228.

**Diepersloot**, R.J.; Bouter, K.P.; Van-Beek, R.; Lucas, C.J.; Masurel, N.; Erkelens, D.W. (1989): Cytotoxic T-cell response to influenza A subunit vaccine in patients with type 1 diabetes mellitus. *Neth. J. Med.* 35 (1-2): 68-75.

**Dietzel**, H.J.; Barbas S.M.; Barbas, C.F.; Burton, D.R. (1994): The nature of the autoimmune antibody repertoire in human immunodeficiency virus type I infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3710.

**Enani**, M.; Fukuda, R.; Ishihama, A. (1985): Transcription and replication of eight RNA segments of influenza virus. *Virology* 142: 68-77.

**Exley**, R.; Gordon, J.; Nathan, P.; Walker, L.; Clemens, M.J. (1987): Anti proliferative effects of Interferons in Daudi Burkitt Lymphoma cells: induction of cell differentiation and loss of response to autocrine growth factors. *Int. J. Cancer* 40: 53-57.

**Ferbas**, J.; Navratil, J.; Logar, A.; Rinaldo, C. (1995): Selective Decrease in Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Induced Alpha Interferon Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells during HIV-1 Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2: 138-142.

**Fesq**, H.; Bacher, M.; Nain, M.; Gemsa, D. (1996): Programmed Cell Death (Apoptosis) in Human Monocytes Infected by Influenza A Virus. *Immunobiol.* 190: 175-182.

**Fesus**, L.; Davies, P.J.A.; Piacentini, M. (1991): Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur. J. Cell. Biol.*, 224: 104-108.

**Fields**, B.N.; Knipe, D.M. (1990): Fields Virology. Second edition, Vol 1 Raven press.

**Garn**, H.; Krause, H.; Enzmann, V.; Drößler, K. (1994): An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadione. J of Immunol Meth 168: 253-256.

**Goodman-Snittkoff**, G.W.; McSharry, J.J. (1980): Activation of mouse lymphocytes by vesicular stomatitis virus. J Virol. 35: 757-765.

**Goodman-Snittkoff**, G.; McSharry, J.J. (1982): Mitogenic activity of Sindbis virus and its isolated glycoproteins. Infect. Immun. 38: 1242-1248.

**Gordon**, J.; Guy, G.R. (1987): The molecules controlling B-lymphocytes. Immunol. Today 8:339-345.

**Gordon**, J.; Cairns, J.A.; Liu, Y.J.; Flores-Romo, L.; MacLennan, I.C.M.; Jansen, K.U.; Bonnefoy, J.Y. (1991): Role of membrane and soluble CD23 in lymphocyte physiology in CD23. A novel multifunctional regulator of the immune system that binds IgE. Monogr. Allergy Basel, Karger 10: 153-157.

**Gray**, D.; Skarvall, H. (1988): B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. Nature 336: 70-73.

**Greenway**, A.L.; Hertzog, P.J.; Devenish, R.J.; Linnane, A.W. (1995): Constitutive and virus-induced interferon production by peripheral blood leukocytes. Experimental Hematology 23: 229-235.

**Hibner**, U.; Benhamou, L.E.; Haury, M.; Cazenave, P.; Sarthou, P. (1993): Signaling of programmed cell death induction in WEHI-231 B lymphoma cells. Eur. J. Immunol. 23: 2821-2825.

**Howard**, F.D. ; Ledbetter, J.A. ; Wong, J. ; Birbez, C.P. ; Stinson, E.B. ; Herzenberg, LaA. (1981): A human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that blocked rosette formation. J. Immunol. 126: 2117-2122.

**Jacob**, Marion (1994): Diplomarbeit „Einfluß von Influenza APR/8 auf periphere humane B-Lymphozyten“.

**Jelinek**, D.F.; Braaten, J.K. (1994): Role of IL-12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation. J. Immunol. 154: 1606-1613.

**Kamoun**, M. ; Kadin, M.E. ; Martin, P.J. ; Nettleton, J. ; Hansen, J.A. (1981): A novel T cell antigen preferentially expressed on mature T cells and shared by both well and poorly differentiated B cell leukemias and lymphomas. J. Immunol. 127: 987-991.

**Kehry**, M. R. (1996): CD40-Mediated Signaling in B Cells. J of Immunology 156: 2345-2348.

**Kerr**, J.F.R.; Harmon, B.V. (1991): In Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death, L.D. Tomei and F.O. Cope, eds., Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 5-30.

**Kirchner**, H.; Darai, G.; Hirt, H.M.; Keyssner, K.; Munk, K. (1978): In vitro mitogenic stimulation of murine spleen cells by herpes simplex virus. J Immunol. 120: 641-645.

**Kizaka**, S.; Goodman-Snittkoff, G.; McSharry, J.J. (1983): Sendai virus glycoproteins are Z cell dependent B cell mitogens. Infect. Immun. 40: 592-600.

**Klenk**, H.D.; Rott, R.; Orlich, M.; Blodorn, J. (1975): Activation of influenza A virus by trypsin treatment. Virology 68: 426-439.

**Korsmeyer, S.J.** (1992): Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80: 879-886.

**Korsmeyer, S.J.** (1992): Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. *Immunology Today* 13: 285-288.

**Lay, W.H.; Mendes, N.F.; Bianco, C.; Nussenzweig, V.** (1971). Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes. *Nature* 230: 531-533.

**Lazarowitz, S.G.; Choppin, P.W.** (1975): Enhancement of the Infectivity of Influenza A and B Viruses by Proteolytic Cleavage of the Hemagglutinin Polypeptide. *Virology* 68: 440-454.

**Linton, P.-J.; Decker, D.J.; Klinman, N.R.** (1989): Primary antibody-forming cells and secondary B cells are generated from separate precursor cell subpopulation. *Cell* 59: 1049-1059.

**Lukacs, N.W.; Chensue, S.W.; Smith, R.E.; Strieter, R.M.; Warmington, K.; Wilke, C.; Kunkel, S.L.** (1994): Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha by inflammatory granuloma fibroblasts. *Am. J. Pathol.* 144: 711-718.

**Luo, H.; Hofstetter, H.; Banchereau, J.; Delespesse, G.** (1991): Crosslinking of CD23 antigen by its natural ligand (IgE) or by anti-CD23 antibody prevents B lymphocyte proliferation and differentiation. *J. Immunol.* 146: 2122-2129.

**Luster, A.D.** (1998): Chemokines- chemoattractic cytokines that mediate inflammation. *The New England Journal of Medicine* 338: 436-445.

**Masushima, K.; Oppenheim, J.J.** (1989): IL-8 and MCAF: Novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF. *Cytokine* 1, 2-13.



**Mayer**, Katrin (1995). Dissertation

**McChesney**, M.B.; Oldstone, M.B.A. (1987): Viruses perturb lymphocyte functions: selected principles characterizing virus-induced immunosuppression. *Ann. Rev. Immunol.* 5: 279-304.

**Mochizuki**, D.; Hedrick, S.; Watson, J.; Kingsbury, D.T. (1977): The interaction of herpes simplex virus with murine lymphocytes. I Mitogenic properties of herpes simplex virus. *J. Exp. Med.* 146: 1500-1510.

**Mock**, D.J.; Domurat, F.; Roberts, N.J.; Walsh, E.E.; Licht, M.R.; Keng, P. (1987): Macrophages are required for influenza virus infection of human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 79: 620-624.

**Mohamadzadeh**, M.; Poltorak, A.N.; Bergstressor, P.R.; Beutler, B.; Takashima, A. (1996): Dendritic cells produce macrophage inflammatory protein-1 gamma, a new member of the CC chemokine family. *J. Immunol.* 156, 3102-3106.

**Mond**, J.J.; Farrar, W.E.; Paul, W.E.; Fuller-Farrar, J.; Schaeffer, M.; Howard, M. (1983): T cell dependence and factor reconstitution of in vitro antibody responses to TNP-B. abortus and restoration of depleted responses with chromatographed fractions of a T cell derived factor. *J. Immunol.* 131: 633-637.

**Muller**, S.; Richalet, P.; Laurent-Crawford, A.; Barakat, S.; Riviere, Y.; Porrot, F.; Chamaret, S.; Briand, J.P.; Montagnier, L.; Hovanessian, A. (1993): Autoantibodies typical of non-organ-specific autoimmune diseases in HIV-seropositive patients. *AIDS* 6: 893.

**Nain**, M.; Hinder, F.; Gong, J.-H.; Schmidt, A.; Bender, A.; Sprenger, H.; Gerns, D. (1990): Tumor necrosis factor- $\alpha$  production of influenza A virus infected macrophages and potentiating effect of lipopolysaccharides. *J. Immunol* 145:1921-1928.

**Nielsen**, L.; Frydenberg, J.; Lind, M.; Deleuran, M.; Stengaard-Pedersen, K.; Deleuran, B. (1997): CD19-selected B lymphocytes synthesize, secrete and migrate in the presence of IL-8. TNF- $\alpha$  and  $\gamma$ IP-10 are also B lymphocyte migratory factors. *Cytokine* 9:747-753.

**Notkins**, A.L.; Mergenhagen, S.E.; Rizzo, A.A.; Scheele, C.; Waldman, T.A. (1966): Elevated  $\gamma$ -globulin and increased antibody production in mice infected with lactic dehydrogenase virus. *Eur. J. Immunol.* 15: 250.

**Nunez**, G.; Merino, R.; Grillo, D.; Gonzalez-Garcia, M. (1994): Bcl-2 and Bcl-x: regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunology Today* 15: 582-588.

**Obarn**, K.; Fukuda, M.; Maeda, S.; Shimada, K. (1986): A cDNA clone used to study nRNA inducible in human tonsillar lymphocytes by a tumor promoter. *Biochem.* 99, 885-894.

**O'Garra**, A.; Umland, S.; de France, T.; Christiansen, J. (1988): B-cell factors are pleiotropic. *Immunol. Today* 9: 45.

**Olsen**, C. W. ; Kehren, J. C.; Dybdahl-Sissoko, N. R.; Hinshaw, V. S.(1996): *bcl-2* Alters Influenza Virus Yield, Spread, and Hemagglutinin Glycosylation. *J of Virology* 70 (1): 663-666.

**Oppenheim**, J.J.; Zachariae, C.O.C.; Mukaida, N.; Matsushima, K. (1991): Properties of the novel proinflammatory supergene „intercrine“ cytokine family. *Annu. Rev- Immunol.* 9, 617-648.

**Pang**, Y.; Norihisa, Y.; Benjamin, D.; Kantor, R.R.S.; Young, H.A. (1992): Interferon- $\gamma$  Gene Expression in Human B-Cell Lines: Induction by Interleukin-2, Protein Kinase C Activators, and Possible Effect of Hypomethylation on Gene Regulation. *Blood* 80: 724-732.

**Peter**, M. E.; Kischkel, F. C.; Scheuerpflug, C. G.; Medema, J. P.; Debatin, K.-M.; Krammer, P. H. (1997): Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. Eur J Immunol 27: 1207-1212.

**Pezzutto**, A.; Dörken, B.; Rabinovitch, P.S.; Ledbetter, J.A.; Moldenhauer, G.; Clark, E.A. (1987): CD19 mononuclear antibody HD37 inhibits anti-immunoglobulin-induced B cell activation and proliferation. J. Immunol. 138: 2793-2799.

**Pfeil**, T.; Fischer, A.; Bujanowski-Weber, J.; Luther, H.; Altmeyer, P.; König, W. (1989): Effect of cytokines on spontaneous and allergen-induced CD23 expression, sCD23 release and Ig(E,G) synthesis from peripheral blood lymphocytes. Immunology 68: 37-44.

**Pistoia**, V. (1997): Production of cytokines by human B cells in health and disease. Immunology Today 18: 343.

**Reed**, J.C. (1994): Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J. Cell. Biol., 124: 1-6.

**Rott**, R. (1977): The Structural Basis of the Function of Influenza Virus Glycoproteins. Med Microbiol. Immunol. 164: 23-33.

**Rott**, O., Cash, E. (1994): Influenza Virus Hemagglutinin Induces Differentiation of Mature Resting B Cells and Growth Arrest of Immature WEHI-231 Lymphoma Cells. J. Immunol. 152: 5381.

**Rott**, O.; Charreire, J.; Mignon-Godefroy, K.; Cash, E. (1995): B Cell Superstimulatory Influenza Virus Activates Peritoneal B Cells. J. Immunol. 155: 134-142.

**Schlueter**, A.J.; Segre, D.; Kuhlenschmidt, M.S.; Segre, M. (1992): Behavior of the idiotypic network in conventional immune response. *Cellular Immunology* 144: 311-323.

**Schultze**, J.L.; Michalak, S.; Seamon, M.J.; Dranoff, G.; Jung, K.; Daley, J.; Delgado, J.C.; Gribben, J.G.; Nadler, L.M. (1997): CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 100 (11): 2757-2765.

**Schwarzmann**, S.W.; Adler, I.L.; Sullivan, R.J.; Marine, W.M. (1971): Bacterial pneumonia during the hong kong influenza epidemic of 1968-1969 experience in a city-county hospital. *Arch. Intern. Med.* 127: 1037-1041.

**Shalaby**, M.R.; Aggarwal, B.B.; Rinderknecht, E.; Svedersky, L.P.; Tinkle, B.S.; Palladino, M.A. (1985): Activation of human polymorphonuclear functions by gamma interferon and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 135: 2069-2073.

**Shapiro**, G.L.; Gurney, T.; Krug, R.M. (1987): Influenza virus gene expression: control mechanism at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J. of Virology* 61: 764-773.

**Sieg**, S.; Huang, Y.; Kaplan, D. (1997): Viral Regulation of CD95 Expression and Apoptosis in T Lymphocytes. *J of Immunol* 159:1192-1199.

**Smith**, G.L.; Hay, A.J. (1982): Replication of the Influenza Virus Genome. *Virology* 118: 96-108.

**Smith**, W.; Andrews, C.H.; Laidlaw, P.P. (1933): A virus obtained from influenza patients. *Lancet* 66-68. In: *The influenza viruses. Virology Monogr.* (Hoyle, L.). Springer Verlag, Wien, New York (1968).

**Snapper**, C.M.; Peschel, C.; Paul, W.E. (1988): IFN- $\gamma$  stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharides. J. Immunol. 140: 2121.

**Song**, C.H.; Calandra, G.B.; Miller, A.; Sercarz, E.E.; Keller, M.A. (1991): Evidence for idiotypic sharing between conventional and naturally activated B cells. Eur. J. Immunol. 21: 2005-2010.

**Splawsky**, J.B.; McAnnally, L.M.; Lipsky, P.E. (1990): IL-2 dependence of the promotion of human B cell differentiation by IL-6 (BSF-2). J. Immunol. 144: 562.

**Sprenger**, H.; Meyer, R.G.; Kaufmann, A.; Bußfeld, D.; Rischkowsky, E.; Gerns, D. (1996): Selective induction of monocyte and not neutrophil attracting chemokines after influenza A virus infection. J. Exp. Med. 184: 1191-1196.

**Srivastava**, M.D.; Srivastava, R.; Srivastava, B.I.S. (1993): Constitutive Production of Interleukin-8 by Normal and Malignant Human B-Cells and Other Cell Types. Leukemia Research 17: 1063-1069.

**Staeheli**, P.; Horišberger, M.A.; Haller, O. (1994): Mx-dependent resistance to influenza viruses is induced by mouse interferons  $\alpha$  and  $\beta$  but not  $\gamma$ . Virology 132: 456-461.

**Stuart-Harris**, C.A. (1961): Twenty years of influenza epidemics. Am. Rev. Respir. Dis. 83: 54-67.

**TeVelde**, A.A.; Rousset, F.; Peronne, C.; DeVries J.E.; Figdor, C.G. (1990): IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  have different regulatory effects on IL-4 induced membrane expression of Fc $\epsilon$ RIIb and release of soluble Fc $\epsilon$ RIIb by human monocytes. J. Immunol. 144: 3052-3059.

**Thompson**, C-B.; Scher, I.; Schaeffer, M.; Lindsten, T.; Finkelman, F.D.; Mond, J.J. (1984): Size dependent B lymphocyte subpopulations: Relationship of cell volume to surface phenotype, cell cycle, proliferative response and requirement for antibody production to TNP-Ficoll and TNP-BA. *J. Immunol.* 133: 2333-2342.

**Tonegawa**, S. (1983): Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575-581.

**Valentine**, M.A.; Licciardi, K.A. (1992): Rescue from anti-IgM-induced programmed cell death by the B cell surface proteins CD20 and CD40. *Eur. J. Immunol.* 22: 3141-3148.

**Van Rompuy**, L.; Min Jou, W.; Huylebriek, D.; Devos, R.; Fiers, W. (1981): Complete nucleotide sequence of the nucleoprotein gene from APR/8 (H0N1). *Eur. J. Biochem.* 116: 347-353.

**Van Rooijen**, N. (1990): Direct intrafollicular differentiation of memory B cells into plasma cells. *Immunol. Today* 11: 154.

**Virelizier**, J.L.; Postlethwaite, R.; Schild, G.C.; Allison, A.C. (1974): Antibody responses to antigenic determinants of influenza virus hemagglutinin. I Thymus dependence of antibody formation and thymus independence of immunological memory. *J. Exp. Med.* 140: 1559.

**Vitetta**, E.S.; Berton, M.T.; Burger, C.; Kepron, M.; Lee, W.T.; Xiao-Ming, Yin (1991): Memory B and T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 193-217.

**Walz**, A; Peveri, P.; Aschauer, A.O.; Baggiolini, M. (1987): Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil activating factor produced by monocytes. *Biochem. Biophysiol. Res. Commun.* 149, 755-761.

**Wolpe**, S.D.; Davatelis, G.; Sherry, B.; Beutler, B.; Hesse, D.G.; Nguyen, H.T.; Moldawer, L.I.; Mathan, C.F.; Lowry, S.F.; Cerami, A. (1988): Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J. Exp. Med.* 167: 570-581.

**Wong**, G.L.; Clark, S.C. (1988): Multiplications of IL-6 with a cytokine network. *Immunol Today* 9: 137.

**Yokata**, S.; Geppert, T.D.; Lipsky, P.E. (1988): Enhancement of antigen and mitogen induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor alpha. *J. Immunol.* 140: 53.

**Yoshimura**, T.; Matsushima, K.; Tanaka, S.; Robinson, E.A.; Appella, E.; Oppenheim, J.J.; Leonard, E.J. (1987): Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor produced by LPS-stimulated human blood mononuclear leukocytes: Partial characterization and separation from IL-1. *J. Immunol.* 139, 788-793.

**Yoshimura**, T.; Yuhki, N.; Moore, S.K.; Appella, E.; Lerman, M.I.; Leonard, E.J. (1989): Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence JE. *FEBS. Lett.* 244, 487-493.

**Zola**, H (1987): The surface antigens of human B lymphocytes. *Immunol. Today* 8:308.

## **Lebenslauf**

---

### **Marion Jacob**

geb. 03.12.64 in Sindelfingen, Kreis Böblingen

#### **Schulischer Werdegang:**

August 1971-Juli 1975:	Besuch der Grundschule
September 1975-Mai 1984:	Besuch des Schickhardt-Gymnasiums in Herrenberg mit dem Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife

#### **Beruflicher Werdegang:**

Oktober 1984- September 1986:	Ausbildung zur Medizinisch-Technischen Assistentin an der staatlich geprüften Lehranstalt für technische Assistenten in der Medizin am Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Oktober 1986-Oktober 1988:	Tätigkeit als wissenschaftliche Medizinisch-Technische Assistentin am Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Oktober 1988:	Beginn des Studiums der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
25.03.94:	Abschluß des Studiums mit der Diplomprüfung
seit April 1994:	Wissenschaftliche Tätigkeit am Institut für Immunologie in Marburg im Rahmen einer Promotionsarbeit

Marburg, 05.08.98



Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren  
Universitätsprofessoren und Dozenten:

Aumüller, Beato, Bestgen, Blatt, Börngen, Braasch, Drenckhahn, Elbel, Elsässer  
Elschenbroich, Fischer, Follmann, Fruhstorfer, Fuchs, Fuhs, Ganßauge, Garten,  
Gemsa, Golenhofen, Grzeschik, Haberich, Habermehl, Hartmann, Herrler,  
Hoffmann, Ihm, Jungclas, Kadenbach, Kaffarnik, Kindl, Kirchner, Klenk, Knoll,  
Koecke, Köhler, Körle, Koolmann, Kretschmer, Lauer, Lefkovits, Löffler, Lührmann,  
Mannherz, Mennel, Müller, Niessing, Petzold, Priebe, Pühlhofer, Reetz, Remmert,  
Rieger, Röhm, Rogausch, Schachtschabel, Schmitz-Moormann, Schneider, Schulz,  
Schwarz, Seifart, Seitz, Slenczka, Thomas, Unsicker, Voigt, von Löw, Wasmuth,  
Wesemann, Wiegandt, Zehner, Ziegler.

**Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Gemsa, der mir die Anfertigung der vorliegenden Arbeit ermöglichte, mir immer mit Rat und Diskussionsbereitschaft zur Seite stand, aber ansonsten freie Hand ließ, in die geheimnisvolle Welt der B-Lymphozyten vorzudringen.

Frau Dr. Marianne Nain danke ich für die Betreuung und die ständige Ansprechbarkeit. In unseren hitzigen Diskussionen haben wir wohl so manches „für´s Leben gelernt“...

Herrn Dr. Dietz gilt mein Dank für seine ständige Bereitschaft, mir behilflich zu sein, Tonsillen zu bekommen, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können. Außerdem bedanke ich mich bei allen an der Pforte der HNO beschäftigten, die geduldig meine vielen Anrufe mit der Frage nach den Röhrchen ertrugen.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Klenk, von dem wir die verschiedenen Influenza A-Viren bekommen haben.

Allen MitarbeiterInnen des Instituts danke ich für die vielen kleinen und großen Hilfen, besonders Ute, die mir in vielen Dingen immer hilfreich zur Seite stand, auch wenn ich mal an Krücken ging...

Ein Dank gilt auch all den Freunden, die mein Leben in Marburg kreuzten, aus meinem Leben traten oder in mein Leben kamen.

Meinen Eltern danke ich für die jahrelange Unterstützung in vielen großen und kleinen Dingen des Lebens.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Einfluß von Influenza A-Viren auf Stoffwechsel, Proliferation. Zytokin- und Chemokinsynthese tonsillärer B-Lymphozyten“ im Institut für Immunologie des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie mit Medizinaluntersuchungsamt der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. D. Gemsa ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

**Jacob, M.;** Nain, M.; Gemsa, D. (1994): Restricted response of purified human B lymphocytes to influenza A virus infection. 10<sup>th</sup> Spring Meeting of the Gesellschaft für Immunologie, Heidelberg. (Abstract)

**Jacob, M.;** Nain, M.; Gemsa, D. (1995): Infection of tonsillar B lymphocytes by influenza A virus. Joint Annual Meeting, Österreichische Gesellschaft für Allergologie und Immunologie and Gesellschaft für Immunologie, Wien. (Abstract)

Gemsa, D.; Fesq, H.; Lehmann, C.; **Jacob, M.;** Halbach, U.; Mayer, K.; Bacher, M.; sprenger, H.; Nain, M. (1995): Macrophage in viral infections. 9<sup>th</sup> Annual confererence of the European Macrophage Study Group, Amsterdam. (Abstract)

Hofmann, P.; Halbach, U.; Lehmann, C.; Sprenger, H.; **Jacob, M.;** Bußfeld, D.; Kaufmann, A.; Kalden, H.; Fesq, H.; Mayer, K.; Bender, A.; Bacher, M.; Nain, M.; Gemsa, D. (1996): Activation of macrophages by influenza A virus infection: Priming for cytokine production and death by apoptosis. Interantional Congress Series, In:

Options for the control of Influenza III. Editors L.E. Brown, A.W. Hampson, and R.G. Webster, Elsevier Science, pp 466-473.

Marburg, den 05.08.98

(Marion Jacob)